

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA LOCALISATION ET DE LA FONCTION DES PROTÉINES ANTISENS
DES RÉTROVIRUS HTLV-3 ET HTLV-4

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

ÉMILIE LAROCQUE

Décembre 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Il est important pour moi de débiter ce mémoire en remerciant le centre de recherche Biomed ainsi que le département des sciences biologiques de l'UQÀM pour m'avoir accueillie et permis de réaliser ce projet dans cet établissement. Ce fut deux merveilleuses années.

Je tiens aussi à remercier les gens qui m'ont entouré lors de mes deux années à la maîtrise, tout particulièrement mon directeur de recherche Benoit Barbeau. Il a su bien m'encadrer tout en me laissant assez de liberté. Je le remercie aussi pour son côté humain et compréhensif.

J'aimerais également remercier mes collègues de laboratoire, Amandine Vargas, pour sa motivation constante et sa bonne humeur contagieuse, Chirine Toufaily pour sa persévérance, ses discussions scientifiques et ses précieux conseils, et Cynthia Torresilla. Un merci spécial aux anciens membres du laboratoire, Marylène Halin, mon maître de stage, et Sébastien Landry dont je suis extrêmement reconnaissante pour tout le temps qu'ils m'ont consacré, les nombreuses questions que je leur ai posées et leur patience continue.

Enfin, un très grand merci à mes parents, Jean-Claude et Francine, mon frère, Jasmin et mon copain Matt pour leur appui et leurs encouragements. Je leur dédie ce mémoire.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
LISTE DES SYMBOLES	XII
RÉSUMÉ	XIII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I.....	3
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 <u>LES RÉTROVIRUS</u>	3
1.1.1 <i>Classification taxonomique</i>	3
1.1.2 <i>Structure génomique</i>	4
1.1.3 <i>Mode de réplication des rétrovirus</i>	5
1.2. <u>LES RÉTROVIRUS HTLV</u>	7
1.2.1 <i>Origine</i>	7
1.2.2. <i>Distribution géographique et pathogénécité</i>	7
1.2.3 <i>Transmissibilité des HTLV</i>	9
1.2.4 <i>Mécanisme d'infection par HTLV</i>	9
1.2.6 <i>Organisation génomique</i>	12
1.3 <u>LA TRANSCRIPTION ANTISENS</u>	17
1.3.1 <i>Transcription antisens chez les procaryotes et les eucaryotes</i>	17
1.3.2 <i>Transcription antisens chez les rétrovirus</i>	18
1.3.3 <i>Transcription antisens chez HTLV-1</i>	20
1.4 <u>HYPOTHÈSE DE TRAVAIL</u>	29
CHAPITRE II	31
ARTICLE 1	31
2.1 <u>CONTRIBUTION DES AUTEURS</u>	31

2.2	<u>HTLV-3 AND HTLV-4 DERIVED ANTISENSE TRANSCRIPTS ENCODE FOR PROTEINS WITH SIMILAR TAX-INHIBITING FUNCTION BUT DISTINCT CELLULAR LOCALIZATION</u>	32
2.2.2	<i>Introduction</i>	34
2.2.3	<i>Methods</i>	36
2.2.5	<i>Discussion</i>	49
2.2.6	<i>Acknowledgments</i>	52
2.2.8	<i>Figures</i>	57
CHAPITRE III		67
ARTICLE 2		67
3.1	<u>CONTRIBUTION DES AUTEURS</u>	67
3.2	<u>HTLV-3 AND HTLV-4 ANTISENSE PROTEINS ACTIVATE JUNB-, C-JUN- AND JUND-DEPENDENT TRANSCRIPTION</u>	68
3.2.1	<i>Abstract</i>	69
3.2.2	<i>Findings</i>	70
3.2.3	<i>Acknowledgments</i>	75
3.2.4	<i>Figure Legends</i>	76
3.2.5	<i>Figures</i>	78
CHAPITRE IV		84
DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE AUX ARTICLES ET CONCLUSIONS		84
4.1	<u>ÉTUDE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE APH-3 ET APH-4</u>	85
4.1.1	<i>Les protéines APH-3 et APH-4 possèdent une localisation majoritairement nucléaire</i>	85
4.1.2	<i>Les protéines APH-3 et APH-4 co-localisent partiellement au noyau avec HBZ</i>	86
4.1.3	<i>Les protéines APH-3 et APH-4 sont aussi nucléolaires</i>	88
4.1.4	<i>APH-3 et APH-4 requièrent des NLS différents de HBZ</i>	90
4.1.5	<i>Évaluation d'un NES chez APH-3</i>	91
4.2	<u>ÉTUDE FONCTIONNELLE DES PROTÉINES APH-3 ET APH-4</u>	92
4.2.1	<i>APH-3 et APH-4 activent la transcription dépendante de la famille Jun</i>	92

4.2.2	<i>APH-3 et APH-4 contiennent un motif « bZIP-like » fonctionnel.....</i>	93
4.2.3.	<i>Modification post-traductionnelle de APH-3.....</i>	96
4.3	<u>CONCLUSION</u>	97
ANNEXE.....		98
RÉFÉRENCES		99

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Différentes étapes du cycle réplcatif rétroviral.....	6
Figure 1.2 : Structure du rétrovirus HTLV-1	11
Figure 1.3. Comparaison des domaines structuraux et fonctionnels de Tax 1 et Tax 2A.....	15
Figure 1.4: Structure tridimensionnelle du «leucine zipper».....	21
Figure 1.5. Structure moléculaire de HBZ.....	22
Figure 1.6. Implication de HBZ sur la régulation de la transcription de HTLV-1 dépendante de Tax.....	24
Figure 1.7. Rôle de HBZ sur la régulation de la transcription par les facteurs transcriptionnels de la famille Jun.....	25
Figure 1.8. Alignement des séquences en acides aminés des protéines antisens des rétrovirus HTLV.....	28
Figure 2.1. Position of the antisense ORF in the HTLV-3 and HTLV-4 genome	57
Figure 2.2. Detection of spliced HTLV-3 and HTLV-4 antisense transcripts.....	58
Figure 2.3. Identification of transcription initiation sites and poly A addition sites for <i>APH-3</i> and <i>APH-4</i> transcripts.....	59
Figure 2.4. Amino acid sequence of the predicted APH-3 and APH-4 proteins.....	61
Figure 2.5. APH-3 and APH-4 demonstrate different cellular localizations.....	62
Figure 2.6. Partial colocalization of APH-3 and APH-4 with HBZ.....	64
Figure 2.7. Antisense expression is upregulated in Jurkat T cells after activation.....	65
Figure 2.8. APH-3 and APH-4 repress Tax1- and Tax3-dependent transactivation of the HTLV-1 LTR.....	66
Figure 3.1. APH-3 and APH-4 activate Jun-dependent transcription of the collagenase promoter without relocalization.....	78
Figure 3.2. Cellular localisation of the deletion mutants of APH-3 and APH-4.....	80
Figure 3.3. Deletion of the APH-3 and APH-4 bZIP-like domain abolishes their impact on transcriptional activation potential of c-Jun and JunD.....	83

Annexe 1. Modulation de la trans-activation par Tax 1 selon les mutants délétion APH-3 et APH-4.....	98
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AD : *activation domain*

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AP-1 : *activator protein 1*

APH : *antisense protein of HTLV*

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATF : *activating transcription factor*

ATL : *adult T-cell leukemia*

ATLL : *adult T-cell leukemia/lymphoma*

ATP: adenosine-5'-triphosphate

BBP : *branch point binding protein*

bp: *base pair*

bpV[pic]: *dipotassium bisperoxo (picolinate) oxovanadate*

BR1/BR2: *basic regions*

bZIP : *basic leucine zipper*

C: cytosine

CBP/p300 : *CREB binding protein / E1A binding protein p300*

CD4 / 8: *cluster of differentiation 4 / 8*

cDNA: *complementary deoxyribonucleic acid*

CPSF: *cleavage and polyadenylation specificity factor*

CRE : *cAMP response element*

CREB: *cAMP response element-binding protein*

DBD: *DNA-binding domain*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

dNTP: *désoxyribonucléotide triphosphate*

DTT: *dithiothréitol*

ECL: *enhanced chemiluminescence*

EDTA: *acide éthylènediaminetétraacétique*

env: *envelope*

FIV: *feline immunodeficiency Virus*

G: *guanine*

gag : *group-specific antigen*

EGFP: *enhanced green fluorescent protein*

GTP: *guanosine-5'-triphosphate*

HAM/TSP: *HTLV-1-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis*

HBZ: *HTLV-1 bZIP factor*

HSPG: *heparan sulfate proteoglycans*

hTERT: *human telomerase reverse transcriptase*

HTLV: *human T-cell lymphotropic virus*

IL: *interleukine*

LTR: *long terminal repeat*

$(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: *magnésium hydroxycarbonate 5-hydrate*

MgSO_4 : *sulfate de magnésium*

MLV: *murine leukemia virus*

mRNA: *messenger ribonucleic acid*

NaCl: chlorure de sodium

NaF: fluorure de sodium

Na₂PO₄: tétraoxophosphate de disodium

NFκB: *nuclear factor-kappa B*

NLS: *nuclear localisation signal*

NP-1: *neuropilin-1*

NP-40: *nonyl phenoxypolyethoxylethanol*

nt: nucléotide

ORF: *open reading frame*

pb: paire de bases

PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*

PBS: *phosphate buffered saline*

PCR: *polymerase chain reaction*

PHA-P: *phytohemagglutinin*

PI: *propidium iodide*

PIC: *pre-initiation complex*

PMA: paraméthoxyamphétamine

PML: *promyelocytic leukemia*

pol: polymérase

poly A: polyadénylation

PTP: *protein tyrosine phosphatase*

pro: protéase

PVDF: *polyvinylidene difluoride*

PTLV: *primate T-cell lymphotropic virus*

R: région unique répétée

RACE: *rapid amplification of cDNA ends*

RexRE: *Rex response element*

RLU : *relative light unit*

RNA: *ribonucleic acid*

RPMI : *roswell park memorial institute*

RT: *rétro-transcriptase*

SA : *site accepteur d'épissage*

SD : *site donneur d'épissage*

SNB : *SUMO-1 nuclear body*

SUMO : *small ubiquitin-like modifier*

TNF α : *tumor necrosis factor α*

LISTE DES SYMBOLES

AA : acide aminé

h : heure

kb : kilobase

kDa : kilodalton

mg : milligramme

µg : microgramme

mM : micromolaire

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

ng : nanogramme

nm : nanomètre

U : unité

V : volt

α : alpha

β : bêta

% : pourcentage

≈ : environ

°C : degré Celsius

RÉSUMÉ

Les rétrovirus appartiennent à une famille de virus où les protéines virales sont codées par un transcrit sens pleine longueur suite à un épissage alternatif. Récemment, notre équipe a contribué à démontrer pour la première fois la présence d'une transcription antisens chez le rétrovirus HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Virus*). Ce transcrit antisens épissé a été caractérisé et semble être initié dans le LTR 3' (*Long Terminal Repeat*), permettant ainsi la production d'une nouvelle protéine virale, nommée HBZ (*HTLV-1 bZIP factor*). Cette dernière est une protéine nucléaire et a été décrite comme étant capable de réguler négativement la transcription virale dépendante de Tax en dimérisant avec des facteurs de transcription cellulaires tels que CREB-2 et certains membres de la famille Jun. Aussi, nous avons découvert et caractérisé des transcrits antisens chez HTLV-2, HTLV-3, HTLV-4 et VIH-1 (*Virus d'Immunodéficience Humaine*). Ce projet de maîtrise avait pour objectif de caractériser les nouvelles protéines APH-3 et APH-4 codées par les transcrits antisens de HTLV-3 et HTLV-4 respectivement. Il s'agissait donc d'étudier leur localisation ainsi que leurs fonctions dans la réplication rétrovirale. D'abord, une comparaison de séquence avec HBZ a permis d'identifier deux régions basiques ainsi qu'un motif « bZIP-like ». Des études de localisation cellulaire de ces protéines ont ensuite été réalisées par microscopie confocale. Ainsi, nous avons démontré que APH-3 et APH-4 apparaissent nucléaires, sous la forme de granules et, dans le cas d'APH-3 partiellement cytoplasmique. Ces granules co-localisent en partie avec HBZ et la nucléoline. Par la suite, des mutants de délétion dépourvus des motifs BR2, BR1 et DBD ont permis de conclure que APH-3 et APH-4 contrairement à HBZ délété se rendent au noyau. Aussi, des études faisant appel au gène rapporteur luciférase précédé d'un promoteur de collagénase (site AP-1), ont démontré que ces deux protéines contrairement à HBZ, activent la transcription dépendante de tous les membres des facteurs de transcription de la famille Jun. De plus, les mutants de délétions ont démontré que le motif « leucine zipper » atypique de ces protéines est impliqué dans cette régulation. Toutefois, une étude utilisant ces mutants de délétions et un gène rapporteur contenant le LTR 5' de HTLV-1 ont suggéré que le motif « leucine zipper » atypique ne semble pas être impliqué dans l'inhibition de la trans-activation par Tax. Finalement, ces travaux ont clairement mis en évidence que les transcrit antisens de HTLV-3 et HTLV-4 sont traduits tout comme chez d'autres rétrovirus. Ces protéines jouent d'importants rôles dans la réplication rétrovirale mais semblent avoir des fonctions différentes de celles de HBZ. Ces études ont permis d'approfondir la biologie moléculaire concernant la famille des rétrovirus et ainsi ouvrir de nouvelles perspectives dans ce domaine.

MOTS CLÉS : APH, rétrovirus, HTLV, transcription antisens, HBZ, Jun, Tax

INTRODUCTION

Les rétrovirus humains sont des virus à ARN simple brin chez lesquels la production de la totalité des protéines dépend de l'expression d'un transcrit sens pleine longueur épissé alternativement. Cependant, il y a quelques années, la découverte d'une nouvelle protéine traduite à partir du brin d'ARN antisens (négatif) du virus HTLV-1, nommé HBZ (*HTLV-1 bZIP factor*), a étonné plusieurs chercheurs. Compte tenu que le mécanisme d'oncogenèse de HTLV-1 est encore mal défini, l'identification d'une nouvelle protéine virale a donné espoir à une meilleure compréhension de la pathogénèse et du cycle réplcatif de ce rétrovirus. Grâce à son domaine « leucine zipper » situé en C-terminal, HBZ a été décrit comme étant capable de réguler la transcription virale dépendante de Tax en dimérisant avec des facteurs de transcription cellulaires tels que CREB-2 et certains membres de la famille Jun. Lorsque HBZ se lie aux facteurs transcriptionnels, la protéine Tax se retrouve ainsi dans l'impossibilité d'interagir avec ceux-ci empêchant la liaison de Tax au TRE (*Tax Responsive Elements*) situé dans la région U3 du LTR (Gaudray et al., 2002). Tax est une protéine impliquée dans le cycle de réplication ainsi que dans l'oncogenèse induite par HTLV-1, ce qui laisse croire qu'HBZ pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse virale. Notre équipe et nos collaborateurs ont tout récemment mis en évidence une deuxième protéine virale codée par le brin antisens chez le rétrovirus HTLV-2. Cette protéine nommée APh-2 (*Antisense Protein of HTLV-2*) possède une localisation nucléaire et réprime la transactivation Tax dépendante tout comme HBZ malgré son domaine « bZIP-like ». En 2005, les rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4 ont été découverts chez des patients Camerounais. Considérant que les rétrovirus HTLV-1 et HTLV-2 ont la capacité d'exprimer un transcrit antisens qui code pour de nouvelles protéines virales, notre équipe s'est donc mise à la recherche d'un transcrit antisens pouvant coder pour des protéines chez ces deux virus. Pour chacun de ces rétrovirus, l'expression d'un transcrit épissé et

polyadénylé codant pour les protéines APH-3 (*Antisense Protein of HTLV-3*) et APH-4 (*Antisense Protein of HTLV-4*) a été démontrée. Le cadre de lecture ouvert de ces nouvelles protéines se situe entre le gène *env* et les gènes *tax/rex*, similairement à HBZ. Des analyses préliminaires *in silico* démontrent que APH-3 et APH-4 semblent posséder un domaine « bZIP-like ». Cependant, ces protéines sont toujours capables d'inhiber la transcription virale dépendante de la protéine Tax, tout comme HBZ et APH-2 (Halin et al., 2009) (Larocque *et al*, résultats non publiés). L'objectif général de cette étude est de déterminer la fonction des protéines APH-3 et APH-4. Il fut en effet intéressant de caractériser les domaines fonctionnels de ces protéines afin d'identifier leurs partenaires d'interactions et ainsi les comparer avec ceux d'HBZ. Pour ce faire, des expériences de microscopie confocale ont été entreprises afin de faire des études de co-localisation. La technique utilisant le gène rapporteur luciférase a été aussi utilisée afin de vérifier le rôle de ces deux protéines dans la transcription dépendante de Tax ainsi que la transcription dépendante des facteurs transcriptionnels de la famille Jun. Enfin, des mutants de délétions ont été également générés afin de localiser les domaines importants dans l'activité de ces protéines. Ces études ainsi que leur poursuite visent en une meilleure compréhension de la réplication rétrovirale.

Pour commencer ce mémoire, une revue de la littérature dans le domaine est présentée à la suite de cette introduction. Il s'en suit une section faisant état de mes résultats expérimentaux obtenus lors de ces deux ans sous forme d'un article scientifique soumis à la revue « Blood » ainsi que d'un « short communication » prêt à être soumis à la revue « Journal of Virology ». En annexe se trouvent des résultats supplémentaires qui ne font pas partie des articles en question. Enfin, une discussion générale englobant les articles et l'annexe conclura le tout en laissant place à des perspectives du projet, c'est-à-dire de futurs et pertinentes expériences.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Les rétrovirus

1.1.1 **Classification taxonomique**

Le « International Committee on Taxonomy of Viruses » (ICTV) classe les virus selon 4 critères majeurs dont le matériel génétique, la symétrie de la capside, la présence ou l'absence d'une enveloppe lipidique et enfin la taille du virion et de la capside (Flint et al., 2004). Les rétrovirus sont une famille de virus à ARN simple brin, de polarité positive ayant un génome diploïde (Flint et al., 2004). De plus, ceux-ci ont une capside de forme icosaédrique et sont entourés d'une enveloppe (Flint et al., 2004). Sept genres font partie de la famille des rétrovirus: les alpharétrovirus, les betarétrovirus, les gammarétrovirus, les deltaretrovirus, les epsilon-rétrovirus, les lenti-rétrovirus et les spumaretrovirus (Burmeister, 2001). Les virus PTLV (*Primate T-cell Leukemia Virus*), qui incluent les rétrovirus HTLV (*Human T-cell Leukemia Virus*) et STLV (*Simian T-cell Leukemia Virus*) en plus des virus BLV (*Bovine Leukemia Virus*) font tous partie du genre deltaretrovirus (Burmeister, 2001). Le ICTV modifie constamment la classification des virus au fur et à mesure que la science évolue et que certaines similitudes ou dissemblances sont mises en évidence. De façon intéressante, certains séparent plutôt la famille des rétrovirus en trois sous groupes selon non

seulement la phylogénie mais également en prenant en considération le type de pathologies associé à une infection; ces trois groupes incluent les oncovirus, les lentivirus et les spumavirus (Fleury, 2009). Les oncovirus comprennent les virus engendrant un cancer ou encore des leucémies, les lentivirus sont des virus dont la maladie s'aggrave avec le temps jusqu'à entraîner la mort et enfin les spumavirus eux ne sont associés à aucune pathologie (Fleury, 2009). Les PTLVs, qui entraînent des leucémies des cellules T ou des lymphomes, font donc partie des oncovirus.

1.1.2 Structure génomique

Il existe deux principales spécificités au mode de réplication des rétrovirus dont la première est la nécessité d'une enzyme découverte en 1970, appelée transcriptase inverse (aussi appelé la reverse transcriptase; RT), et codée par le gène *pol*. Cette découverte a réformé le dogme de la biologie moléculaire qui auparavant insistait sur le fait que l'expression du matériel génétique était unidirectionnelle (Flint et al., 2004). Lors de la transcription inverse, la RT synthétise un ADN double brin à partir de l'ARN viral pour ensuite être flanqué par deux LTR (*Long terminal Repeat*) identiques nécessaires à la transcription virale (Flint et al., 2004). La deuxième enzyme particulière à cette famille est l'intégrase (IN) également codée par le gène *pol*, permettant au virus de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte ce qui, en conséquence, altère l'hérédité de la cellule infectée (Flint et al., 2004). Les rétrovirus se divisent en deux grandes catégories: simples et complexes. La structure génomique du premier groupe est caractérisée par la présence des gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* codant pour les protéines enzymatiques et structurales (Flint et al., 2004). D'un autre côté, les rétrovirus complexes possèdent en plus des gènes non structuraux codant pour des protéines dites régulatrices et accessoires, leur permettant d'exercer une régulation plus rigoureuse de leur transcription (Flint et al., 2004). Les virus HTLVs ainsi que le VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine) sont tous des rétrovirus dits complexes.

1.1.3 Mode de répllication des rétrovirus

Le cycle de répllication des rétrovirus débute par l'attachement des glycoprotéines de l'enveloppe du virus aux récepteurs cellulaires spécifiques (Figure 1.1) (Coffin et al., 1997). Ceci permet de cibler des types cellulaires spécifiques et donne une spécificité aux rétrovirus en terme de tropisme. Les membranes cellulaire et virale peuvent ensuite fusionner, permettant la pénétration de la capsid du virus dans la cellule hôte. Ensuite, dans le cytoplasme, il y a décapsidation et l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN grâce à la transcriptase inverse. C'est spécifiquement lors de cette étape qu'il y a duplication des LTRs. L'ADN est ensuite transloqué vers le noyau et s'intègre dans l'ADN chromosomal à l'aide de l'enzyme intégrase seulement lors d'une division cellulaire (dans le cas de HTLV). Le provirus est alors transcrit tout comme les gènes cellulaires puisque celui-ci en fait maintenant partie. L'ARNm peut ensuite être traduit une fois dans le cytoplasme. Lors de la dernière étape du cycle répllicatif, le virion se forme grâce à l'assemblage de l'ARN génomique avec les protéines virales pour ensuite sortir de la cellule par bourgeonnement afin que la particule virale puisse infecter une nouvelle cellule hôte (Coffin et al., 1997).

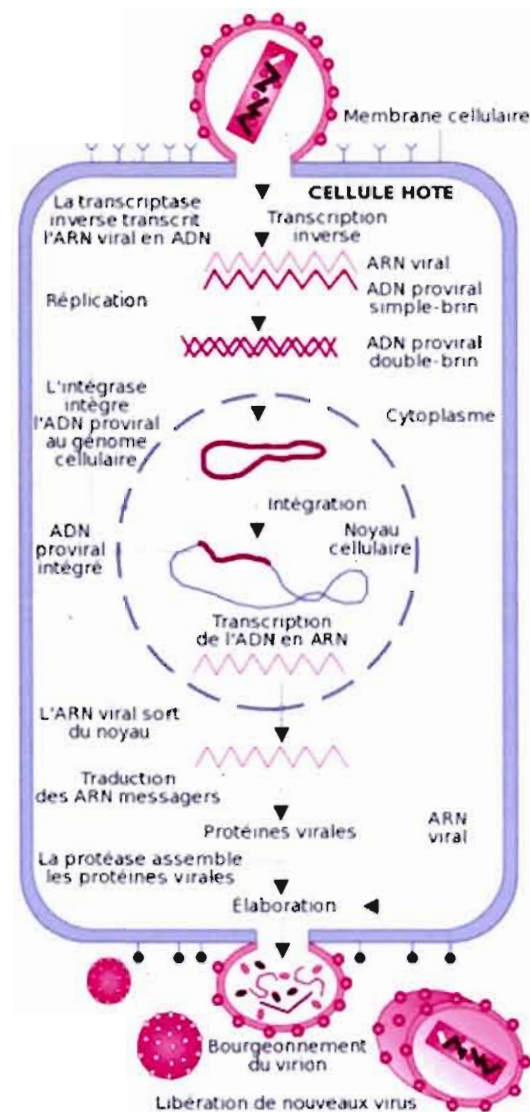


Figure 1.1. Différentes étapes du cycle réplcatif rétroviral. Le virus s'attache aux récepteurs cellulaires *via* les glycoprotéines. Les membranes fusionnent permettant la pénétration de la capsid dans la cellule. Ensuite, il y a décapsidation et transcription inverse de l'ARN. L'ADN est transloqué au noyau pour ensuite être intégré à l'ADN chromosomal grâce à l'intégrase. Après la transcription, l'ARNm transloqué dans le cytoplasme est traduit permettant l'assemblage des protéines virales avec l'ARN génomique produisant un virion prêt à bourgeonner. Image modifiée et tirée de : http://fr.wikipedia.org/wiki/Virus_de_l'immunod%C3%A9ficience_humaine

1.2. Les rétrovirus HTLV

1.2.1 Origine

Comme mentionné précédemment, le groupe des rétrovirus PTLVs inclut les virus HTLVs et STLVs, qui font partie du genre *Deltarétrovirus*. Selon les études phylogénétiques, STLV aurait été transmis à l'humain par des interactions inter-espèces, comme par exemple lors de la chasse (Slattery et al., 1999). C'est en 1980 que le premier rétrovirus humain, HTLV-1, a été découvert chez un patient avec un diagnostic de « Cutaneous T-cell Lymphoma » aussi appelé « Sezary T-cell Leukemia » (Poiesz et al., 1980). L'année suivante, HTLV-2 a également pu être isolé d'un patient atteint de « Hairy T-cell Leukemia » (Kalyanaraman et al., 1982). Ce n'est seulement qu'en 2005 que les rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4 ont par la suite été découverts en Afrique chez des camerounais suite à une réactivité croisée avec les anticorps spécifiques à HTLV-1 et HTLV-2 (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005). Cependant, très peu d'informations sont jusqu'à ce jour disponibles sur ces nouveaux rétrovirus.

1.2.2. Distribution géographique et pathogénécité

Il a été estimé qu'entre 15 et 20 millions d'individus au niveau mondial sont infectés par HTLV-1, plus particulièrement au Japon, dans les Caraïbes, en Afrique centrale, au sud-est de l'Asie, et en Amérique du Sud (Proietti et al., 2005). Ce virus est le premier rétrovirus à avoir été relié au développement du cancer chez l'humain. Même si dans la majorité des cas les gens sont asymptomatiques, environ 5% des personnes infectées sont atteintes de maladies graves et souvent mortelles telles que l'ATLL (*Adult T Cell Leukemia/Lymphoma*) ou HAM/TSP (*HTLV-1 Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis*) après une période de latence de 20 à 40 ans (Murphy et al., 1989). Présente surtout dans la population

au sud-ouest du Japon, l'ATLL est caractérisée par une immortalisation des lymphocytes T CD4+ entraînant des leucémies ou des lymphomes (Burmeister, 2001). Des symptômes variés sont observés chez ces patients comme des lésions de la peau, de l'hypertrophie des ganglions lymphatiques, du foie et de la rate, etc... et pour cette raison quatre sous-types cliniques d'ATLL ont été établis : aiguë, lymphome, chronique et « *smoldering* ». Dépendamment de la classification de l'ATLL, les personnes atteintes finissent par mourir entre 6 mois et 4 ans (Tamura, 1996). D'un autre côté, l'HAM/TSP est une neuromyélopathie (Iwasaki, 1990). La manifestation de cette maladie est caractérisée par une démyélinisation du système nerveux central, ainsi qu'une perte des axones, un « spastic paraparesis », un mauvais fonctionnement du sphincter et un dérangement au niveau sensoriel des extrémités (Nakagawa et al., 1996). La plupart des cas de cette maladie ont été répertoriés dans les Antilles et au Japon. De façon intéressante, la population des Antilles et les femmes semblent être plus à risque de développer cette maladie (Hisada et al., 2004; Kramer et al., 1995).

Un nombre moins important d'individus sont infectés par HTLV-2 (statistique non évaluée). Ce virus est endémique dans la population amérindienne mais représente une épidémie chez les IVDA (*Intravenous Drug Abuser*) à travers le monde, et est répandu chez les donneurs de sangs (Briggs et al., 1995; Cimarelli et al., 1995; Egan et al., 1999; Etzel et al., 2001; Fukushima et al., 1995; Khabbaz et al., 1991). De plus, une étude a démontré que HTLV-2 est plus répandu chez les individus atteints de VIH-1 que chez les individus sains (Egan et al., 1999). Ceci entraîne des difficultés à évaluer les pathologies associées à une infection par HTLV-2. Jusqu'à présent, la littérature laisse croire que ce virus n'entraîne pas une maladie spécifique. Par contre, certains cas ont été rapportés où les patients infectés étaient atteints de désordres neurologiques pouvant s'apparenter à l'HAM/TSP (Feuer and Green, 2005). De façon intéressante, HTLV-2 a été isolé chez 2 patients atteints de « *hairy cell leukemia* », d'un patient IVDA avec des symptômes du SIDA et d'un patient atteint de l'hémophilie A, ce qui laisse la porte ouverte à des maladies hématologiques tout comme une infection par HTLV-1 (Hahn et al., 1984; Kalyanaraman et al., 1982; Rosenblatt et al., 1986).

Puisque HTLV-3 et HTLV-4 ont été découverts récemment avec seulement quelques cas (3 cas pour HTLV-3 et 1 cas pour HTLV-4), aucune corrélation avec le développement

d'une quelconque maladie n'a toujours pas été démontrée jusqu'à présent. Cependant, ceci ne signifie pas qu'aucune maladie n'est associée à une infection par ces deux nouveaux rétrovirus. Des analyses de séquences génomiques de type comparatif pourraient nous apporter beaucoup d'informations quant au niveau de la pathogénicité et de la transmissibilité de HTLV-3 et HTLV-4. De plus, dû au très faible échantillonnage d'individus « positifs » pour HTLV-3 et HTLV-4, au manque de matériel pour le criblage de ces infections, à l'échantillonnage biaisé (les individus dans les hôpitaux souffrant d'une quelconque maladie sont exclus) et enfin due à la longue période de latence avant le développement d'une maladie, il est trop tôt pour faire une telle affirmation. De façon intéressante, HTLV-3 diverge beaucoup de HTLV-1 et HTLV-2 partageant seulement 62% d'homologie (Switzer et al., 2006). Cette même étude mentionne également que HTLV-3 semble être un rétrovirus unique puisque son génome ne partage qu'environ 87 à 92% d'homologie avec son équivalent simien, STLV-3 (Switzer et al., 2006). HTLV-4 est le seul à ne pas avoir d'homologue simien, ce qui entraîne un questionnement sur son apparition et son évolution. Des études cliniques sont donc requises afin d'évaluer la pathogénicité de HTLV-3 et HTLV-4.

1.2.3 Transmissibilité des HTLV

La transmission des HTLVs se fait de façon horizontale par le transfert des lymphocytes infectés entre les partenaires. Ce transfert a lieu lors de rapports sexuels entre les gens, d'exposition à du sang contaminé (transfusion sanguine, IVDA) (Gallo, 2005). La transmission peut également se faire de façon verticale, c'est-à-dire de la mère à l'enfant durant l'allaitement maternel (Gallo, 2005).

1.2.4 Mécanisme d'infection par HTLV

Très peu de particules virales infectieuses sont produites lors d'une infection par HTLV-1 contrairement au VIH. Cette observation concorde avec le fait que les cellules T

CD4+ nécessitent un contact cellule-cellule afin de répandre l'infection par ce rétrovirus. En fait, une étude a démontré que la méthode par prolifération clonale (transmission cellule-cellule) est 100 fois plus efficace que par infection avec des particules virales (Delamarre et al., 1997). Le mécanisme d'infection débute par l'interaction entre deux lymphocytes grâce à la glycoprotéine de surface (gp46). Le premier récepteur découvert interagissant avec la gp46 est GLUT-1 (Coskun and Sutton, 2005; Manel et al., 2003). Par la suite, à l'aide de lymphocytes T CD4+ primaires, une équipe a mis en évidence que le récepteur « *heparan sulfate proteoglycans* » (HSPGs) était le plus important chez HTLV-1 alors que GLUT-1 était le récepteur primaire pour HTLV-2 qui infecte majoritairement les cellules T CD8+ (Jones et al., 2006). Enfin, l'interaction de la protéine de l'enveloppe avec divers récepteurs modifie le tropisme du virus (Jones et al., 2006). La liaison entre la glycoprotéine de surface et son récepteur (facteur déterminant de l'infectivité) peut entraîner la formation d'un syncytium (Delamarre et al., 1997). Lors de l'interaction, la protéine Gag (p19 et p15) forme un amas à la « synapse virologique » (jonction cellule-cellule) dans la cellule infectée via un processus médié par la polarisation du centre d'organisation des microtubules (MTOC) vers cette synapse (Igakura et al., 2003). Le mécanisme par lequel les microtubules sont polarisés n'est pas dû à la reconnaissance d'antigènes HTLV-1 spécifiques, mais plutôt par deux signaux; un signal vient de la cellule infectée et l'autre signal est engendré par le contact entre les deux cellules. En fait, il a été démontré que la protéine virale Tax est non seulement nucléaire mais elle est aussi présente à proximité du MTOC associé au cis-Golgi et dans la synapse (Nejmeddine et al., 2005). Ainsi, cette étude a mis en évidence que Tax seul est capable de polariser le MTOC (Nejmeddine et al., 2005). En parallèle, le groupe de Bangham a aussi démontré que les molécules de surface de cellules T ICAM-1 et LFA-1 pouvaient également induire une polarisation du MTOC dans les cellules infectées par HTLV-1 et que ces molécules agiraient en synergie avec la protéine Tax (Barnard et al., 2005; Nejmeddine et al., 2005). Ensuite, après une période de contact de deux heures entre les deux cellules, la protéine Gag ainsi que l'ARN de HTLV-1 sont transportés à partir de la cellule infectée vers la cellule saine (lymphocytes T CD4+ ou CD8+) à travers la synapse virologique, infectant une nouvelle cellule (Igakura et al., 2003).

1.2.5 La structure des rétrovirus HTLVs

Les virions HTLV ont une taille d'environ 100 nm de diamètre (figure 1.2). Ces particules virales contiennent tout d'abord deux brins d'ARN positifs monocaténaux. Ces deux brins sont associés à des protéines telles que la transcriptase inverse (p62/p32) ainsi que la nucléocapside (p15). Un manteau nommé capsid (p24) entoure le tout, offrant une certaine protection du matériel génétique contenu à l'intérieur. La capsid est elle aussi entourée d'une matrice (p19). Ensuite, une enveloppe formée d'une bicouche lipidique obtenue à partir de l'enveloppe cellulaire lors du bourgeonnement entoure la matrice et présente à sa surface deux types de protéines; les glycoprotéines transmembranaires (gp21) et de surface (gp46).

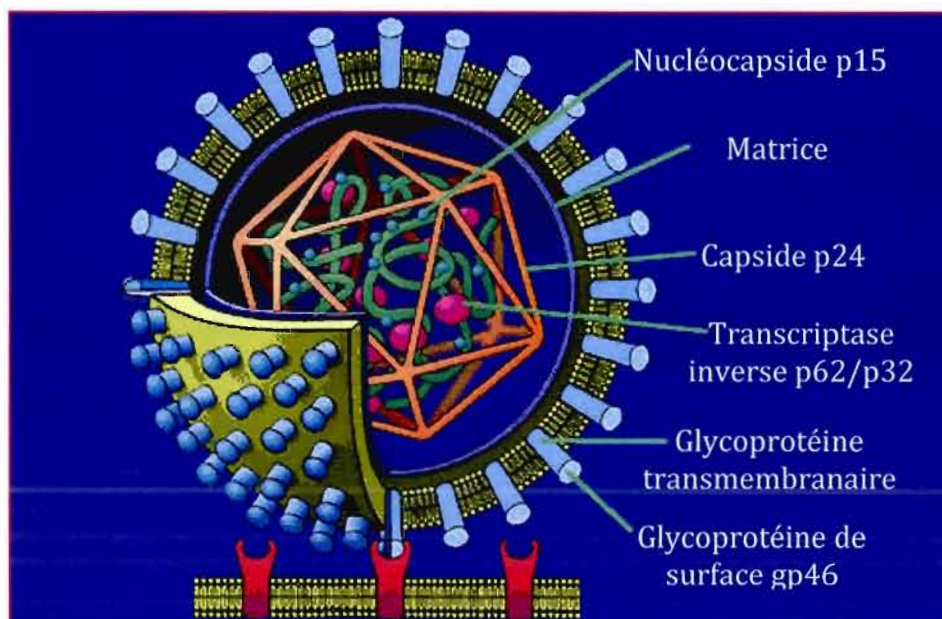


Figure 1.2 : Structure du rétrovirus HTLV-1. Le virion contient deux brins d'ARN positifs monocaténaux associés à la transcriptase inverse et la nucléocapside entourés par une capsid. La capsid est entourée d'une matrice et ensuite d'une enveloppe de bicouche lipidique présentant les glycoprotéines transmembranaires et de surface. Image tirée et modifiée de : http://fr.wikipedia.org/wiki/Virus_de_l'immunod%C3%A9ficiency_humaine.

1.2.6 Organisation génomique

Le génome ARN des rétrovirus HTLVs est constitué d'environ 9 kb. Comme chez les autres rétrovirus, il compte les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* (Coffin et al., 1997). Le gène *gag* code pour les protéines de structure interne telles que la capside, la nucléocapside et la matrice. Le gène *pro* code pour la protéase. Le gène *pol* code pour la transcriptase inverse et l'intégrase alors que le gène *env* code pour les glycoprotéines de surface et transmembranaire. Puisque ces rétrovirus font partie de la famille des rétrovirus complexes, il y a également une région appelée pX située en amont du LTR 3'. Cette région code pour les protéines régulatrices Tax et Rex, et les protéines accessoires p27 et p12 (ORF I) et p30 et p13 (ORF II) (Bindhu et al., 2004). Les protéines Tax et Rex jouent des rôles importants puisqu'elles régulent l'expression virale, Tax en étant un trans-activateur de la transcription et Rex en contrôlant le transport des ARNm (Younis and Green, 2005). Les génomes sont également bordés par deux régions non traduites appelées LTR (*Long Terminal Repeat*) identiques au niveau de leur séquence mais non au niveau de leur fonction. Les LTRs sont divisés en trois segments nommés U3, R et U5 : le LTR 5' joue le rôle de promoteur viral et le LTR 3' est impliqué dans la terminaison de la transcription et la polyadénylation des transcrits. La région U3 contient les séquences activatrices comme les TRE et la région R contient le signal de polyadénylation (Coffin et al., 1997).

1.2.6.1 La protéine régulatrice Tax

Comme mentionné précédemment, les rétrovirus HTLVs codent pour des protéines accessoires impliquées dans la pathogenèse permettant une régulation de la réplication plus rigoureuse. Une des protéines régulatrices la plus étudiée chez ces virus est une protéine majoritairement nucléaire et codée par la région pX du génome : Tax. Cette protéine de 40kDa, régule l'expression de plusieurs protéines cellulaires et virales *via* des éléments « *enhancers* », jouant un rôle primordial dans la transformation cellulaire et étant reconnue comme une onco-protéine virale dû à son activité transactivatrice.

Tax interagit avec plusieurs facteurs de transcription de la famille ATF/CREB (*Activating Transcription Factor/cAMP Response Element Binding-protein*). Dans la région U3 du LTR, Tax se lie indirectement à une région nommée TRE (*Tax Response Element*) caractérisée par 3 répétitions de 21bp contenant un élément CRE (*Cyclic AMP Response Element*) (Kashanchi and Brady, 2005). L'interaction de Tax aux TRE se fait *via* le facteur de transcription CREB qui se lie aux séquences CRE. Tax peut par la suite recruter le co-activateur CBP/p300 (*CREB-binding Protein*) et accomplir son rôle de transactivateur de la transcription virale. Une autre voie par laquelle Tax active la transcription est la voie de NF- κ B (Kashanchi and Brady, 2005). Cependant, cette transactivation est une conséquence indirecte de la liaison de Tax à certaines cibles régulant l'activité de NF- κ B comme I κ B (*Inhibitor of Factor NF- κ B*) permettant ainsi à NF- κ B de se lier à l'élément κ B pour activer la transcription (Chu et al., 1999; Harhaj and Sun, 1999; Moriuchi et al., 1999; Suzuki et al., 1993; Watanabe et al., 1993; Yin et al., 1998). De plus, Tax active indirectement la transcription dépendante des sites AP-1 en augmentant la transcription des gènes c-Jun, JunD, c-Fos et Fra-1 formant le complexe AP-1 (*Activator Protein-1*), permettant à ceux-ci de se lier au site de liaison AP-1 (Fujii et al., 1991; Iwai et al., 2001; Tsuchiya et al., 1993).

Il a aussi été démontré que Tax rend le génome instable en modifiant la régulation des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et conséquemment modifie les réponses de la cellule hôte aux dommages à l'ADN ce qui peut entraîner la transformation cellulaire (Chandhasin et al., 2008). De plus, Tax empêche l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en inactivant p53, inhibant ainsi l'élimination des cellules mutées (Azran et al., 2004).

1.2.6.2 Tax et la pathogénicité

Même si HTLV-1 et HTLV-2 sont tous les deux capables d'immortaliser et transformer les lymphocytes T, ces deux rétrovirus diffèrent dans la manifestation de la maladie; HTLV-1 est associé à des leucémies des cellules T alors que chez HTLV-2, quelques cas où les patients ont développé certaines maladies neurodégénératrices ont été rapportés (Araujo and Hall, 2004). De façon intéressante, Bartman et *al.* (2008) ont récemment démontré qu'une hyperprolifération lymphocytaire à long terme est associée à une

infection par HTLV-2 (Bartman et al., 2008). Plusieurs recherches se concentrent afin de déterminer ce qui diffère chez ces deux rétrovirus. D'autres recherches se consacrent à élucider les différences entre les protéines Tax 1 et Tax 2 afin d'expliquer les différents symptômes reliés à ces virus. Les protéines Tax 1 et Tax 2 ont environ 78% d'homologie (ce pourcentage peut varier dépendamment du sous-type de HTLV-2) et sont impliquées dans la régulation de la transcription ainsi que dans le cycle cellulaire (Figure 1.3) (Banerjee et al., 2007; Sieburg et al., 2004). Cependant, il a été démontré que Tax 1 possède un plus important potentiel transformant que Tax 2. En effet, Tax 1 peut transformer les cellules CTLL-2 interleukine-2 dépendante à interleukine-2 indépendante (Tsubata et al., 2005). Cette différence est attribuée au domaine PDM (*PDZ domain binding motif*) que possède Tax 1, alors que Tax 2 ne le possède pas (Tsubata et al., 2005). Ce domaine a été caractérisé comme étant nécessaire pour la transformation des cellules et permet à Tax 1 d'interagir et d'inactiver d'autres protéines possédant un domaine PDM comme certaines protéines suppressives de tumeur telles que Dlg1 et Scribble (Okajima et al., 2008; Suzuki et al., 1999; Tsubata et al., 2005).

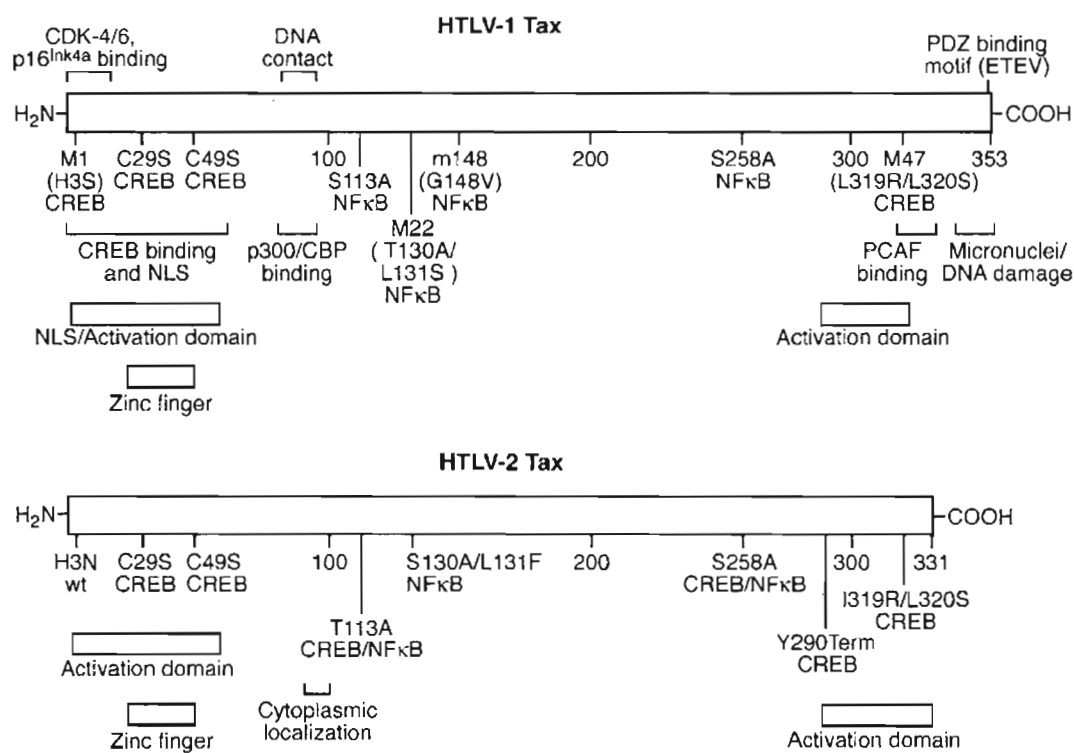


Figure 1.3. Comparaison des domaines structuraux et fonctionnels de Tax 1 et Tax 2A. Tax 1 et Tax 2 ont plusieurs domaines homologues tels que le domaine d'activation et le doigt de zinc à l'extrémité N-terminale. Un domaine d'activation se retrouve également en C-terminal pour ces deux protéines. Cependant, nous pouvons voir à l'extrémité 3' de Tax 1 un domaine de liaison PDZ qui n'est pas présent chez Tax 2. Image tiré de (Feuer and Green, 2005)

De façon intéressante, ce domaine PDM est également présent chez d'autres protéines pouvant transformer les cellules comme par exemple la protéine E6 du virus HPV type 16 et E4ORF1 de l'adénovirus type 9 (Aoyagi et al., 2010). Dans cette étude, une protéine Tax 1 chimère a été produite en substituant le domaine PDM de Tax1 avec soit le PDM de E6 du virus HPV type 16 ou soit celui de E4ORF1 de l'adénovirus type 9. Les résultats ont démontré que Tax 1 chimère pouvait toujours transformer les lymphocytes T suggérant donc que ce domaine joue un rôle très important dans la transformation et donc

dans l'oncogénèse spécifique aux sous-types de HTLV (Aoyagi et al., 2010). Cependant, le mécanisme précis par lequel Tax transforme initialement les cellules est toujours mal compris. Suite à la découverte des nouveaux virus HTLV-3 et HTLV-4, il serait pertinent de ce poser la question à savoir si ceux-ci possèdent également un domaine PDM comme Tax 1. Cependant, peu d'études se sont concentrées sur cet aspect ; seulement deux publications portent sur la protéine Tax 3 (Calattini et al., 2006; Switzer et al., 2006) .

De façon intéressante, une des plus grandes homologues observée entre HTLV-3 et les autres PTLVs est dans la séquence en acides aminés du gène *tax* (Switzer et al., 2006). De plus, un alignement de séquences a démontré que les régions fonctionnelles sont préservées chez Tax 3 (Calattini et al., 2006; Switzer et al., 2006). Comme mentionné précédemment, il est spéculé que les différences pathologiques associées à HTLV-1 et HTLV-2 sont dues à la présence du motif de liaison PDM ayant comme séquence (S/T)XV-COOH. Cette séquence est en effet retrouvée dans la région C-terminale de Tax 3 laissant donc croire que HTLV-3 pourrait être associé à une transformation cellulaire des lymphocytes T tout comme HTLV-1 (Calattini et al., 2006; Switzer et al., 2006). Aucune étude n'a encore été réalisée sur Tax 4 afin de vérifier si celle-ci contient ce même domaine.

Tout récemment, une autre région s'est avérée importante pour la transformation par Tax 1. Celle-ci est localisée entre les acides aminés 225-232 (Shoji et al., 2009). De plus, cette région est hautement conservée à travers les PTLVs-1 (Shoji et al., 2009). Tax 3 contient le PDM mais non la région conservée des acides aminés 225 à 232 alors que Tax 2 ne contient aucun des deux (Shoji et al., 2009). Ceci suggère que le motif PDM en combinaison avec la région conservée 225-232 jouent un rôle important dans l'activité transformante élevée. Ceci pourrait expliquer les différences en terme de pathogénicité entre HTLV-1, HTLV-2 et HTLV-3 (Shoji et al., 2009) (HTLV-4 n'a pas encore fait partie de ces études).

De façon intéressante, Tax est rapidement exprimée suite à une infection par HTLV et entraîne une augmentation de la transcription virale dû à son potentiel transactivateur. Par contre, dans les cellules ATLL, l'expression de Tax est fortement réprimée (Miyazaki et al., 2007). Il a été démontré que dans les cellules ATLL, le LTR 5' est souvent éliminé ou encore

hyperméthylé, entraînant une inhibition de l'expression de Tax (Matsuoka and Jeang, 2007; Miyazaki et al., 2007). De plus, il a aussi été démontré que la séquence codante de Tax subit plusieurs mutations pouvant provoquer une perte de l'activité de celle-ci dans les cellules ATLL. Le mécanisme de pathogenèse menant à l'ATLL reste donc toujours mal compris.

1.3 La transcription antisens

1.3.1 Transcription antisens chez les procaryotes et les eucaryotes

Il a été démontré que l'expression génique pouvait être régulée au niveau de l'ARN par un phénomène appelé la transcription antisens. Les transcrits antisens naturels (NAT) ont d'abord été mis en évidence chez les bactéries et les phages. Le premier article porte sur le gène *lacZ* de *E.coli* avec une étude *in vivo*. Cette étude a démontré que lorsqu'un ARN complémentaire au gène *LacZ* codant pour la β -Galactosidase chez *E.coli* s'hybridait à l'ARN messager, la traduction de cette protéine était inhibée (Pestka et al., 1984; Rubenstein et al., 1984). En parallèle, trois autres groupes ont indépendamment démontré le phénomène de la transcription antisens cette même année (Izant and Weintraub, 1984; Mizuno et al., 1984; Rubenstein et al., 1984); une des recherches portait sur le gène codant pour une des protéines majeures de la membrane externe, OmpF chez *E.coli* (Mizuno et al., 1984). Il s'agit dans ce cas ci d'un trans-NAT; l'ARN complémentaire à l'ARNm de OmpF est situé dans une région en amont du promoteur du gène *ompC* et contient 70% d'homologie avec une partie de la séquence du gène *ompF* (Mizuno et al., 1984). Cette homologie s'est démontré suffisante afin d'inhiber l'expression de OmpF. La transcription antisens a aussi été démontrée chez le phage λ (Hoopes and McClure, 1985). Une équipe avait préalablement observé qu'il y avait une inhibition de l'expression des gènes tardifs CII-dépendants due à une baisse de la protéine Q, un antiterminateur de transcription (Court et al., 1975). Cette inhibition était en effet le résultat de la diminution de l'expression de la protéine Q due à un trans-NAT retrouvé dans le promoteur P_E nommé P_{aQ} (Hoopes and McClure, 1985).

Ainsi, la transcription antisens chez les procaryotes joue donc divers rôles importants au niveau biologique tels que dans la régulation de l'expression des gènes, la réplication de

plasmide, la transposition et le contrôle partiel du développement d'un bactériophage (Vanhee-Brossollet and Vaquero, 1998). Ce phénomène a non seulement permis aux biologistes moléculaires d'acquérir cette nouvelle information mais a permis à ces derniers de pouvoir aujourd'hui utiliser les transcrits antisens comme un outil afin d'étudier le rôle de protéines spécifiques.

Plusieurs NAT ont par la suite été mis en évidence chez les organismes eucaryotes comme par exemple *C. elegans* (Lee et al., 1993), *Dictyostelium discoideum* (Hildebrandt and Nellen, 1992), bombyx du mûrier (Skeiky and Iatrou, 1990), drosophile (Lankenau et al., 1994), les amphibiens (Kimelman and Kirschner, 1989), le poulet (Farrell and Lukens, 1995), et même jusqu'à certains mammifères comme le rat, la souris et même chez l'être humain (Bedford et al., 1995; Miyajima et al., 1989; Murphy and Knee, 1994). Certains virus ont même des transcrits antisens comme EBV (Prang et al., 1995), HSV-1 (Gordon et al., 1988), Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (HHV-8) (Xu and Ganem), et autres. Ces transcrits antisens pourraient également jouer un rôle important au niveau de la régulation de l'expression génique tout comme les transcrits antisens chez les procaryotes mais pourraient aussi agir comme matrice pour être traduits en protéine (Vanhee-Brossollet and Vaquero, 1998). En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que certains NAT pouvaient en effet être traduits : rev-ErbA α (Lazar et al., 1989), Latency-Associated Antigen of type 1 du virus (Doerig et al., 1991) et P-ORF (Lagunoff and Roizman, 1994). Ces deux derniers venant du virus HSV-1. Malgré ces études, la traduction des transcrits antisens demeure un domaine controversé.

1.3.2 Transcription antisens chez les rétrovirus

Plusieurs transcrits antisens ont été caractérisés chez les rétrovirus ces dernières années. Il a été suggéré par quelques groupes que le rétrovirus VIH-1 pourrait potentiellement contenir un NAT complémentaire au gène de l'enveloppe puisque l'on retrouve un 10^{ième} ORF conservé (Ludwig et al., 2006; Michael et al., 1994b; Miller, 1988; Peeters et al., 1996). Miller (1988) a été la première équipe à émettre l'hypothèse qu'une nouvelle protéine hydrophobe de 20kDa pourrait possiblement être traduite à partir de cet ARNm (Miller, 1988; Vanhee-Brossollet et al., 1995). Ce transcrit antisens a par la suite été

mis en évidence (Landry et al., 2007; Vanhee-Brossollet et al., 1995). Par la technique de RT-PCR le transcrit a été détecté dans des lignées infectées ainsi que dans une lignée transfectée avec un clone proviral. Des expériences de 5' RACE et de 3' RACE ont permis de déterminer que ce transcrit est initié dans le LTR 3' et qu'il contient plusieurs sites d'initiation en plus de la séquence consensus du signal de la queue poly A (Landry et al., 2007). À l'aide d'une construction avec le gène rapporteur de la luciférase cloné en antisens dans l'ADN proviral, nous avons démontré que ce gène antisens pouvait en effet être exprimé en plus d'être régulé par des activateurs de cellules T ou par la protéine Tat (Landry et al., 2007). Lors de ces trois dernières années, nous avons réussi à détecter la protéine traduite à partir de ce transcrit antisens nommée ASP (*AntiSense Protein*) par immunobuvardage de type Western, par microscopie confocale et par cytométrie en flux (Landry *et al.*, résultats non publiés).

Un autre lentivirus chez lequel la transcription antisens a été caractérisée est le FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*) (Briquet et al., 2001). Cet ORF consensus dans une vingtaine d'isolats est complémentaire au gène de l'enveloppe et contient la séquence RRE en antisens tout comme celui retrouvé chez le VIH. Cet ARNm coderait également pour une protéine hydrophobe si ce transcrit était traduit (Briquet et al., 2001).

MLV (*Murine Leukemia Virus*) est le premier rétrovirus simple chez lequel un transcrit antisens a été mis en évidence (Rasmussen et al., 2010). Ce transcrit initié dans le LTR 3' a été détecté dans des lymphomes de cellules B et de cellules T induits par différentes souches de MLV (Rasmussen et al., 2010). Rasmussen et al. (2010) ont démontré l'effet positif sur la croissance des cellules de réticulosarcomes lorsque cet ARNm est traduit *in vitro* (Rasmussen et al., 2010). Toutes ces évidences laissent croire que la transcription antisens semble jouer un rôle important chez la famille des rétrovirus simples et complexes puisque ces ORF ont été conservés au cours de l'évolution.

1.3.3 Transcription antisens chez HTLV-1

1.3.3.1 La protéine antisens HBZ

1.3.3.1.1 La transcrit antisens HBZ

En 1989, des ARN de 2.5Kb et de 2.9Kb ont été détectés à partir du brin complémentaire de HTLV-1 pour la première fois (Larocca et al., 1989). Il y a quelques années, une nouvelle protéine possédant un bZIP et codée à partir du brin complémentaire de HTLV-1 a été découverte à l'aide d'expériences de criblage de double-hybride chez la levure (Gaudray et al., 2002). Notre équipe a par la suite caractérisé l'ARNm en utilisant les techniques de 5'RACE et de 3'RACE. Les résultats obtenus ont démontré que le transcrit retrouvé sur le brin complémentaire de l'ARN de HTLV-1 possède plusieurs sites d'initiation dans le LTR 3' et qu'il est polyadénylé (Cavanagh et al., 2006). Ensuite, des études transcriptionnelles ont permis d'identifier deux autres isoformes d'HBZ résultant d'épissages alternatifs, soit HBZ SP1 et SP2 (Cavanagh et al., 2006). La forme SP1 de HBZ semble être la plus importante lors d'infections *in vivo* et *in vitro* et elle possède également un effet inhibiteur sur l'activation transcriptionnelle dépendante de Tax tout comme l'isoforme non épissé (Cavanagh et al., 2006). De façon intéressante, l'existence d'une nouvelle protéine virale résulte de la traduction de cet ARNm que les auteurs ont nommé HBZ (*HTLV-1 bZIP factor*) (Gaudray et al., 2002).

1.3.3.1.2 Organisation de HBZ

HBZ est une protéine nucléaire de 209 acides aminés possédant un domaine bZIP retrouvé à l'extrémité carboxyle d'où son nom. Les domaines bZIP ont deux caractéristiques : reconnaître une séquence d'ADN spécifique et la capacité à former des dimères. La première activité se fait via une région riche en résidus basiques adjacents au motif « leucine zipper » permettant donc l'interaction avec la séquence d'acide nucléique au niveau du sillon majeur (Landschulz et al., 1988). La formation de dimère se fait grâce au

motif « leucine zipper ». Ce type de motif est retrouvé chez les facteurs de transcription eucaryotiques et est conséquemment impliqué dans la régulation de l'expression génique. Un résidu de leucine est retrouvé tout les 7 acides aminés et ce sur environ 30 à 40 résidus et permet au peptide, lorsqu'il se replie, de former une hélice α amphipatique dite « coiled-coil » (O'Shea et al., 1991; O'Shea et al., 1989). Les leucines sont stratégiquement placées et se retrouvent d'un seul côté de cette hélice formant donc un côté hydrophobe lui permettant ainsi de constituer un homodimère ou un hétérodimère avec une autre hélice α (*coiled-coil*) (Figure 1.4) (Alber, 1992; Busch and Sassone-Corsi, 1990; O'Shea et al., 1989).

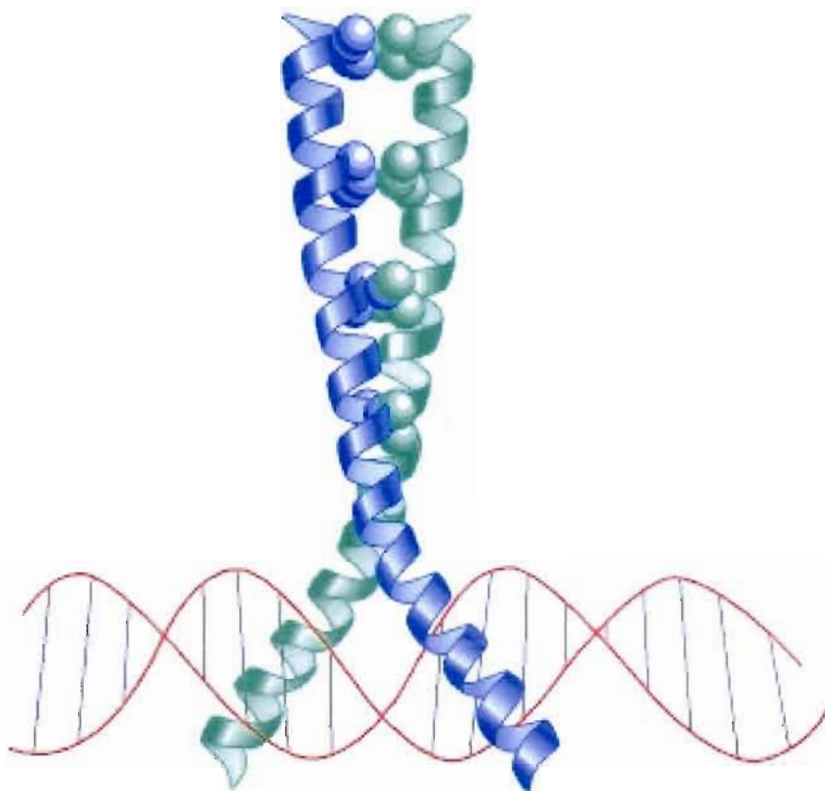


Figure 1.4: Structure tridimensionnelle du « leucine zipper ». Une protéine X est représentée en bleu et une protéine Y est représentée en vert. Chaque boule au centre représente une leucine. Les leucines de la protéine X se lient aux leucines de la protéine Y par une interaction hydrophobe formant un hétérodimère. Le domaine de liaison à l'ADN est en forme de ciseaux dans le sillon majeur de l'ADN permettant à l'hétérodimère de réguler l'expression génique. Image tirée de (Brown, 2002).

Le « leucine zipper » de HBZ est caractérisé par 5 heptades de leucine (en plus d'une isoleucine en 5' du motif LZ) et est précédé par un DBD (*DNA Binding Domain*) mais ce dernier étant non fonctionnel (Hivin et al., 2005; Switzer et al., 2006). En plus de ce motif, HBZ a un domaine d'activation en N-terminal et deux régions basiques BR1 et BR2 en amont du domaine d'activation (Figure 1.5).



Figure 1.5. Structure moléculaire de HBZ. En N-terminal se retrouve un domaine d'activation (AD), suivi de deux régions basiques BR1 et BR2. Un domaine de liaison à l'ADN (DBD) précède le domaine « leucine zipper ». Image tirée de (Hivin et al., 2005).

1.3.3.1.3. Localisation cellulaire de HBZ

Une étude sur des mutants de délétions HBZ fusionnés à la protéine fluorescente GFP a démontré que les domaines BR1, BR2 et DBD contiennent tous les trois un signal de localisation nucléaire ainsi nommé NLS (*Nuclear Localisation Signal*) (Hivin et al., 2005). Cependant, cette même étude a mis en évidence que seulement 2 de ces domaines sont suffisants pour attribuer la localisation nucléaire à HBZ peu importe la combinaison des domaines (Hivin et al., 2005).

De plus, la localisation nucléaire de HBZ est représentée par des structures ponctuées relativement grosses au niveau du noyau (Basbous et al., 2003; Gaudray et al., 2002). Puisqu'il existe plusieurs sous-compartiments nucléaires tels que les corps Cajal (CB),

« promyelocytic leukemia » (PML), le compartiment de facteur d'épissage (SFC), « nuclear lamina », « nuclear speckle », « paraspeckles », nucléoplasme, et autres, une étude s'est intéressée à identifier le sous-compartiment dans lequel ces structures sont associées. Par des expériences de co-transfection, de microscopie confocale et de microscopie électronique, les auteurs ont pu éliminer les corps Cajal et les compartiments de facteur d'épissage. De façon intéressante, ils ont démontré que HBZ co-localisait avec un membre de la famille des protéines HP1 (*Heterochromatin-associated proteins*), HP1 α endogène, strictement retrouvée dans les régions de l'hétérochromatine (Hivin et al., 2005). Sa localisation sous-nucléaire reste donc toujours à être identifiée.

1.3.3.1.4 Interaction et fonction de la protéine HBZ

Les premières études fonctionnelles réalisées sur HBZ ont démontré par la technique de co-immunoprécipitation que HBZ interagissait par son domaine « leucine zipper » avec CREB-1 et CREB-2. De plus, deux des isoformes d'HBZ, la forme non épissée (HBZ) et la forme épissée (HBZ SP1), pouvaient toutes les deux inhiber la trans-activation dépendante de Tax en formant un complexe avec le facteur transcriptionnel CREB-2 et CBP/p300 (Figure 1.6) (Yoshida et al., 2008). L'interaction entre HBZ et CREB-2 compétitionne indirectement avec celle de Tax et CREB-2 ; l'hétérodimère HBZ-CREB-2 empêche CREB-2 de se lier à son partenaire Tax, une association nécessaire pour lier le TRE localisé dans le LTR et activer la transcription. Une étude a également démontré que CBP/p300 co-immunoprécipitait avec HBZ, et que l'inhibition de la trans-activation par Tax était également régulée à ce niveau (Clerc et al., 2008). Cependant, cette régulation semble relativement faible lorsqu'on la compare avec l'inhibition par HBZ et CREB-2.

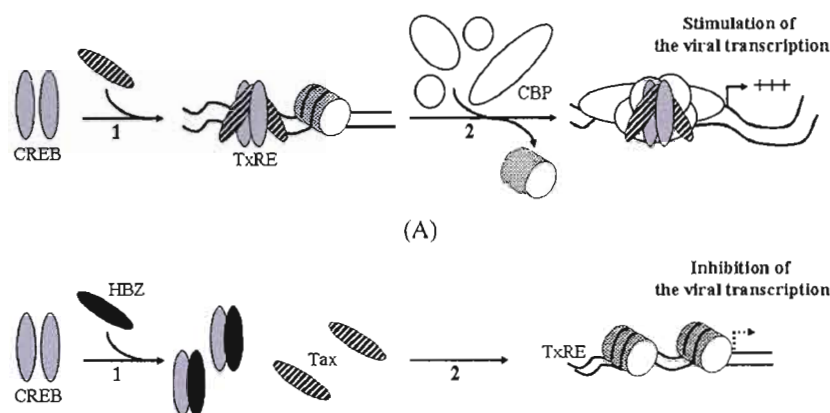


Figure 1.6. Implication de HBZ sur la régulation de la transcription de HTLV-1 dépendante de Tax. Tax et CREB forment un complexe en se liant au TxRE. CBP/p300 vient se lier au complexe et la transcription virale est stimulée. Lorsque HBZ se lie à CREB, Tax et CREB ne peuvent plus former un complexe. La transcription virale est conséquemment inhibée. Image Tirée de (Barbeau and Mesnard, 2007).

D'autres partenaires d'interaction de HBZ sont les protéines faisant partie de la famille Jun : JunB, c-Jun et JunD. Des études ont mis en évidence la capacité de HBZ à inhiber l'activité transcriptionnelle de c-Jun en favorisant sa dégradation par le protéasome (Figure 1.7) (Basbous et al., 2003; Hivin et al., 2006; Matsumoto et al., 2005). En fait, une étude a démontré, en générant un HBZ chimère contenant le domaine de liaison à l'ADN de c-Fos, que cette diminution de la transcription était en effet due à la séquestration de c-Jun relocalisé dans les corps nucléaires et non due à la faible efficacité d'HBZ de lier à l'ADN (Clerc et al., 2009). Enfin, c-Jun n'est plus en mesure de se lier au site AP-1, ce qui entraîne une baisse de la transcription. HBZ inhibe également la transcription dépendante de JunB en modifiant sa localisation cellulaire dans des corps nucléaires (figure 1.7) (Basbous et al., 2003; Hivin et al., 2007). Cette re-localisation inhibe également la transcription dépendante de JunB. Contrairement aux autres protéines Jun, lorsque HBZ interagit avec JunD, la transcription dépendante de JunD est augmentée (figure 1.7) (Thebault et al., 2004). Aussi, il a été démontré que l'hétérodimère HBZ/JunD interagit avec le facteur de transcription Sp1 (Kuhlmann et al., 2007). Ce complexe peut ensuite se lier au promoteur de la télomérase humaine (hTERT) afin d'activer la transcription de cette dernière. De façon intéressante, une

corrélation a été observée entre l'augmentation de la transcription de hTERT et les cellules ATLL (Uchida et al., 1999). HBZ pourrait donc être impliquée dans le développement de l'ATLL (Kuhlmann et al., 2007).

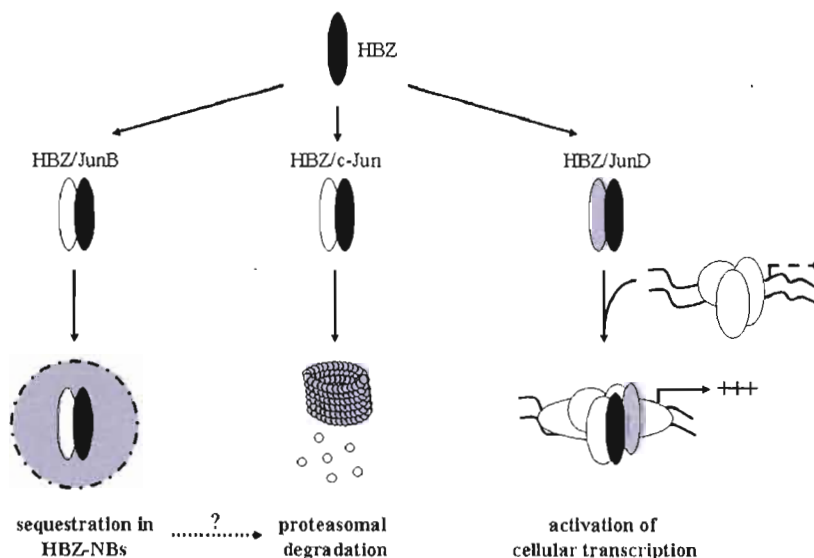


Figure 1.7. Rôle de HBZ sur la régulation de la transcription par les facteurs transcriptionnels de la famille Jun. HBZ inhibe l'activation de la transcription régulée par JunB et c-Jun en séquestrant JunB dans des corps nucléaires inactifs (gauche) et en engendrant la dégradation de c-Jun par le protéasome (centre). Cependant, HBZ module l'activité transcriptionnelle dépendante de JunD de façon positive (droite). Image tirée de (Barbeau and Mesnard, 2007).

Tout récemment, d'autres protéines cellulaires ont été identifiées comme partenaire d'interaction avec HBZ *via* le motif « leucine zipper ». Dans la dernière année, une équipe a démontré que HBZ interagissait avec les facteurs de transcription MAFB et MAFG lorsqu'un site MARE (séquence promotrice reconnue par ce type de facteur de transcription) est présent et aussi ATF2, CEBPG, et CREBZF (Ohshima et al., 2010; Reinke et al., 2010). Ainsi, HBZ régule la capacité transactivatrice de plusieurs proto-oncogènes ; cette idée appuie le fait qu'HBZ joue un rôle important au niveau du développement de la maladie.

1.3.3.1.5 HBZ et l'ATLL

Le virus HTLV-1 entraîne une infection persistante; la réponse immune adaptative ne parvient jamais à éliminer ce virus. Après un temps d'incubation d'environ 40 ans, la maladie peut se développer et le patient succombe alors à l'infection. Plusieurs recherches portent donc sur l'implication de HBZ dans l'apparition de l'ATLL afin de comprendre l'évolution de cette maladie. Des études ont démontré que HBZ est nécessaire à l'infection, la réplication et la persistance virale *in vivo* (Arnold et al., 2008). De plus, un groupe de recherche a mis en évidence que l'ARN messager de HBZ induit la prolifération cellulaire (Satou et al., 2006). Aussi, plusieurs études ont également révélé l'expression de cette protéine dans les cellules ATLL contrairement à la protéine virale Tax qui est souvent absente (Cavanagh et al., 2006; Satou et al., 2006). Comme il a déjà été mentionné, la protéine trans-activatrice Tax est une oncoprotéine impliquée dans la transformation cellulaire. Son expression induit une réponse des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), ce qui pourrait rendre difficile la survie du virus et de la cellule infectée et transformée (Bangham, 2003). Tax induit également l'expression de la protéine antisens HBZ (Landry et al., 2008; Yoshida et al., 2008). De façon intéressante, HBZ régule l'expression de Tax en interagissant avec plusieurs facteurs de transcription; HBZ interagit avec CREB-2 en formant un dimère *via* son motif « leucine zipper », empêchant ce dernier de se lier au TRE *via* une interaction avec Tax. Une diminution de la transcription virale dépendante de Tax est conséquemment engendrée (Gaudray et al., 2002). L'hypothèse d'une stratégie rétrovirale consistant à limiter l'expression de la protéine Tax dans le but de tromper le système immunitaire serait donc plausible et expliquerait les résultats de Satou *et al.* (Satou et al., 2006). En fait, il a été démontré récemment que HBZ est une protéine immunogénique puisqu'elle est reconnue par les CTL. Cependant, aucun CTL spécifique à HBZ n'est produit. Les auteurs de cette recherche supposent que ceci est potentiellement dû à la faible expression de HBZ dans les cellules infectées par HTLV-1 (Suemori et al., 2009).

Puisque le rôle de Tax dans la transformation cellulaire a été clairement démontré, il est possible que HBZ joue plutôt un rôle important dans la prolifération des CD4⁺ et dans la persistance *in vivo* (Arnold et al., 2006; Arnold et al., 2008; Satou et al., 2006). Il devient donc de plus en plus probant que HBZ est impliqué dans un mécanisme complexe pour

permettre aux cellules infectées par HTLV-1 de déjouer le système immunitaire. HBZ pourrait potentiellement être une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'ATLL ou le HAM/TSP.

1.3.3.2 La protéine antisens APH-2

Suite à la découverte de HBZ, notre équipe s'est intéressée à voir si un transcrit antisens pouvait également être présent chez HTLV-2. En effet, nous avons mis en évidence un transcrit initié dans le LTR 3' (ayant plusieurs sites d'initiation), épissé et polyadénylé. Ce transcrit a été détecté grâce à des expériences de RT-PCR dans toutes les lignées cellulaires infectées par HTLV-2, dans les lymphocytes mis en culture à partir de patients infectés par HTLV-2 ainsi que dans 4 donneurs de sang HTLV-2 positifs sur 15 (Halin et al., 2009). Ce transcrit code pour une protéine de 183 acides aminés, nommée APH-2 (*Antisense Protein of HTLV-2*). Selon des analyses en microscopie confocale, cette protéine se situe au noyau tout comme HBZ mais est exclue des nucléoles (Halin et al., 2009). De façon intéressante, APH-2 contient un domaine « bZIP-like » contrairement à HBZ. Cependant, ceci n'empêche pas APH-2 d'interagir avec CREB *in vivo* (interaction détectée par des expériences de co-immunoprécipitation) et d'inhiber la trans-activation par Tax 2 (Halin et al., 2009). APH-2 n'interagit pas avec p300 malgré la présence d'une séquence LXXLL-like et le motif CBP. Nous avons donc émis comme hypothèse que la position en C-terminal de ce motif comparativement à HBZ (motif en N-terminal) pourrait expliquer ce résultat non attendu. De plus, APH-2 ne semble pas jouer un rôle *in vivo* contrairement à HBZ. Ainsi, lorsque des lapins sont inoculés avec une version mutée pour l'ORF de APH-2, aucun changement n'a été observé au niveau de la capacité de transformer les cellules et de la charge provirale (Green et al., 1995). Cependant, il est important de mentionner que cette mutation implique plusieurs gènes viraux dits accessoires. Aussi, il reste toujours à déterminer si la différence de pathogénicité entre HTLV-1 et HTLV-2 est due au caractère unique de ces protéines antisens ou celles de Tax 1 et Tax 2.

1.3.3.3 Les transcrits antisens APH-3 et APH-4

Lors des deux dernières années, notre équipe a mis en évidence l'existence d'une transcription antisens chez les rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4. Nous avons découvert que, chez ces deux rétrovirus, un transcrit antisens épissé et polyadénylé était exprimé. La taille et la position de l'intron de ces transcrits sont semblables à ceux retrouvés chez HBZ SP1. De plus, nos études préliminaires ont également démontré que les protéines APH-3 et APH-4 semblent avoir un effet sur la transcription régulée par Tax. Ceci laisse croire que APH-3 et APH-4 pourraient interagir avec CREB-2 ou d'autres facteurs transcriptionnels tout comme HBZ et que APH-3 et APH-4 ont possiblement un motif « leucine zipper » atypique fonctionnel.

Cependant, la protéine APH-3 semble être unique et posséder des fonctions possiblement différentes. Dans un premier temps, la séquence en acide aminé de APH-3 est relativement différente de celle de HBZ (environ 30% d'homologie avec HBZ) (Figure 1.8).

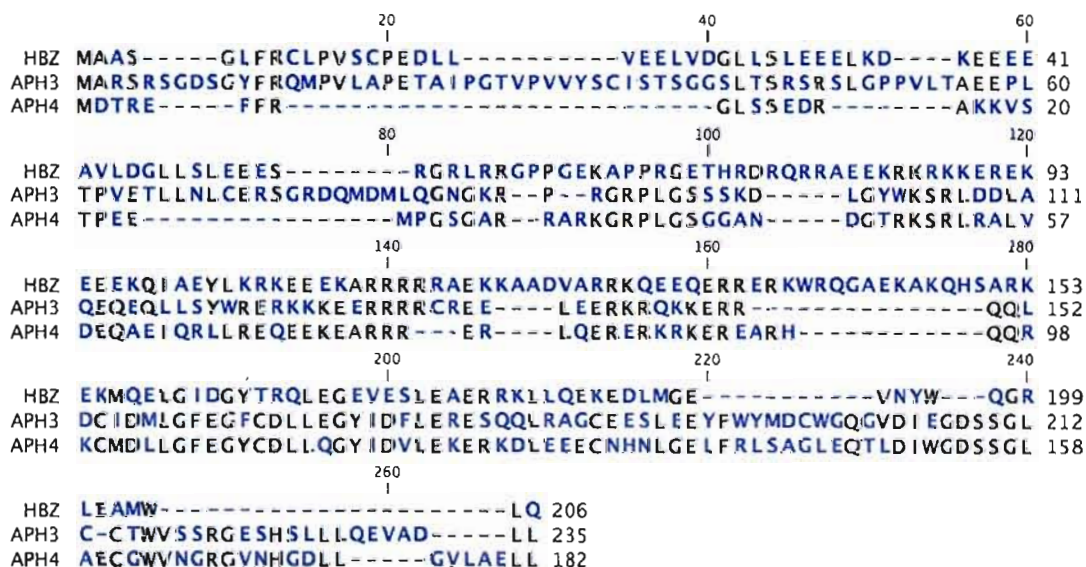


Figure 1.8. Alignement des séquences en acides aminés des protéines antisens des rétrovirus HTLV. On retrouve les séquences de HBZ (ligne 1), APH-3 (ligne 2) et APH-4 (ligne 3). Les acides aminés en noir représentent les résidus homologues alors que les résidus en bleu sont différents.

Mentionnons également que les séquences protéiques d'APH-3 et d'APH-4 semblent contenir un motif « leucine zipper » atypique et non reconnu selon les analyses bioinformatiques (heptade non respecté puisque qu'une leucine se retrouve à tous les 6-8 résidus). Cependant, il a été démontré chez HBZ que la localisation nucléaire est engendrée par la présence de trois motifs soit BR1, BR2 et DBD. Fait intéressant, les séquences codantes d'APH-3 et APH-4 ont une région constituée de résidus très basiques pouvant être possiblement à l'origine de leur localisation nucléaire.

1.4 Hypothèse de travail

Il a été démontré chez HTLV-1 qu'il existe un transcrit antisens initié à partir du LTR 3' codant pour la protéine HBZ (Gaudray et al., 2002). Cette nouvelle protéine virale a une localisation nucléaire sous forme de « speckles » selon les observations en microscopie confocale. Cette protéine peut former des dimères avec divers facteurs de transcription *via* son domaine « leucine zipper » pour ensuite moduler la transcription dépendante de Tax et des facteurs de transcription de la famille Jun (Barbeau and Mesnard, 2007). Récemment, notre équipe a mis en évidence un transcrit antisens chez HTLV-2 permettant l'expression d'APH-2. Cette nouvelle protéine a également une localisation nucléaire et peut interagir avec le facteur de transcription CREB *in vivo* malgré la présence d'un domaine « leucine zipper-like » (Halin et al., 2009). De plus, APH-2 semble inhiber la trans-activation par Tax de façon similaire à HBZ (Halin et al., 2009). En parallèle, notre équipe a caractérisé un transcrit antisens chez les nouveaux rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4 nouvellement découverts. Ces transcrits antisens ont plusieurs similarités avec le transcrit de HBZ et codent pour les protéines nommées respectivement APH-3 et APH-4. L'hypothèse de cette recherche était donc que les transcrits *APH-3* et *APH-4* des rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4 codent pour de nouvelles protéines virales jouant un rôle important dans la réplication rétrovirale. Ces protéines pourraient aussi potentiellement avoir des fonctions différentes de celles d'HBZ au

niveau de la biologie moléculaire de ces rétrovirus. C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce projet dont l'objectif principal était de caractériser les nouvelles protéines APH-3 et APH-4 au niveau de leur localisation ainsi que de leur fonction. Ainsi, l'implication de ces protéines sur la transcription rétrovirale a été étudiée et leurs domaines fonctionnels analysés. Ces informations sont nécessaires à la compréhension des modes mécanistiques de la réplication et de la pathogénicité suite à une infection par HTLV.

CHAPITRE II

ARTICLE 1

2.1 Contribution des auteurs

Titre de l'article :

HTLV-3 and HTLV-4 derived antisense transcripts encode for proteins with similar Tax-inhibiting function but distinct cellular localization

Auteure principale : Émilie Larocque

Collaborateurs : Dre Susan Marriott et Dr William Switzer

Directeur de recherche : Dr Benoit Barbeau

Ce premier article a été rédigé par moi-même Émilie Larocque avec l'aide du Dr Barbeau. L'étude portant sur la localisation et la fonction des protéines a également été réalisée par moi-même alors que la caractérisation des transcrits a été effectuée par Marilène Halin. Sébastien Landry a également participé à la caractérisation des transcrits ainsi qu'aux idées scientifiques. Les vecteurs d'expression de Tax 3 et Tax 4 ont été fournis par Dre Susan Marriott. Aussi, Dr Switzer nous a fourni les ADN proviraux de HTLV-3 et HTLV-4. De plus, cette étude réalisée dans le laboratoire du Dr Barbeau a ainsi conduit à cet article rédigé selon les exigences de l'Université du Québec à Montréal. La version soumise au journal « Blood » a cependant été modifiée afin de répondre à leurs exigences.

2.2 HTLV-3 and HTLV-4 derived antisense transcripts encode for proteins with similar Tax-inhibiting function but distinct cellular localization

Running title: Antisense transcripts and encoded protein in HTLV-3 and HTLV-4

Émilie Larocque^{1*}, Marilène Halin^{1,5*}, Sébastien Landry^{1,6}, Suzan Marriott³, William Switzer⁴ and Benoit Barbeau^{1,2†}

¹Département des Sciences Biologiques et ²Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, 2080 Saint-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2X 3X8, ³Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston TX 77030; ⁴Laboratory Branch, Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV, STD, and TB prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333; ⁵Current address: Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, 10675 John Jay Hopkins Drive, San Diego, CA, 92121 ; ⁶Current address: Laboratory of Genetics (LOG-W), Salk Institute for Biological Studies, Post Office Box 85800, San Diego, CA 92186-5800

* Authors have contributed equally to this work.

† Correspondance to Benoit Barbeau, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, 2080 Saint-Urbain Montréal, Québec, Canada H2X 3X8. Tel: 514 987-3000 ext.4576, Fax: 514 987-4647, E-mail: barbeau.benoit@uqam.ca

Word count (abstract): 188; word count (text): 5242; figure count: 8; reference count: 47

2.2.1 Abstract

Newly discovered HTLV-3 and HTLV-4 viruses are part of the HTLV retrovirus family composed of the well-known HTLV-1 and HTLV-2. Antisense transcription in retroviruses has been highlighted and conclusively demonstrated in HTLV-1 and HTLV-2. These transcripts further lead to the synthesis of viral proteins termed HBZ and APH-2, respectively. As potential ORFs are present in the antisense strand of HTLV-3 and HTLV-4, herein we tested whether antisense transcription occurred in these viruses and whether it could encode a protein. Using proviral DNA constructs, antisense transcripts were detected by RT-PCR. These transcripts were spliced, polyadenylated and initiated at multiple sites from the 3' LTR. Resulting proteins termed APH (Antisense Protein of HTLV)-3 and APH-4 were devoid of a bZIP domain but contained basic-rich regions. Confocal microscopy and Western blot experiments demonstrated a nuclear-restricted pattern for APH-4 while being both cytoplasmic and nuclear for APH-3. Both proteins showed partial co-localization with nucleoli and HBZ-associated structures. Finally, both proteins inhibited Tax1- and Tax3-mediated HTLV-1 LTR activation. These results provide support that retroviral antisense transcription is not exclusive to HTLV-1 and that APH-3 and APH-4 could impact on HTLV-3 and HTLV-4 replication.

2.2.2 Introduction

Human T-cell Leukemia Viruses (HTLV) are human deltaretroviruses, which are part of the Primate T-cell Lymphotropic Virus (PTLV) group and are constituted of two well studied members known as HTLV-1, the first retrovirus to be isolated in human (Miyoshi et al., 1981; Poiesz et al., 1980; Poiesz et al., 1981; Yoshida et al., 1982) and HTLV-2. HTLV-1 bears important significance in terms of human health as this virus is the etiological agent of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). Unlike HTLV-1, HTLV-2 has only been seriously linked to HAM-like pathologies (and not to leukemia). Recently, two new HTLV viruses, termed HTLV-3 and HTLV-4, have been isolated, the former having been closely compared to HTLV-3 (Calattini et al., 2006; Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005). Currently, these viruses have been isolated in a relatively low number of individuals from Africa and no pathologies (such as Large Granuloma Leukemia (Duong et al., 2008; Thomas et al., 2010)) have yet been associated with these viruses.

The discovery of these two retroviruses has led to a series of recent studies comparing them to HTLV-1 and HTLV-2. These studies have indeed demonstrated that both HTLV-3 and HTLV-4 shared similar genomic organization to the former human retroviruses and weak but reproducible cross-reactivity with HTLV-1 and HTLV-2-specific antibodies were observed (Calattini et al., 2006; Calattini et al., 2005; Switzer et al., 2006; Wolfe et al., 2005). Further studies have focussed on the Tax3 protein of HTLV-3 and have highlighted its similarity with HTLV-1 Tax in terms of both intracellular localization and transactivation activity (Calattini et al., 2006; Chevalier et al., 2006). A recent study has also provided evidence that the HTLV-3 genome, when reconstituted, produces infectious particles (Chevalier et al., 2008). Interestingly, alike HTLV-1, these reports have also pointed toward the existence of a potential ORF, which could be produced from the antisense strand of both HTLV-3 and HTLV-4 viruses (Calattini et al., 2006; Chevalier et al., 2008; Switzer et al., 2006).

Former studies had shed light on the existence of a new unexpected retroviral protein named HBZ (HTLV-I bZIP), which is encoded by the antisense strand of the HTLV-1 genome (Gaudray et al., 2002). Typically, two HBZ isoforms are produced with one of them being most abundant and dependent on a spliced transcript (Cavanagh et al., 2006; Murata et al., 2006; Satou et al., 2006). Both HBZ isoforms block Tax-induced and basal HTLV-1 transcription and interact with several Jun family members, rendering some of these members inactive through degradation or possible sequestration in transcriptionally inactive nuclear bodies (Basbous et al., 2003; Hivin et al., 2007; Matsumoto et al., 2005; Thebault et al., 2004). However, further studies have demonstrated that HBZ acted positively on JunD upon interaction and in fact was mediating an augmentation of gene expression of the telomerase hTERT component through this transcription factor (Hivin et al., 2006; Kuhlmann et al., 2007; Thebault et al., 2004). Other transcription factors such as NF- κ B and MafG are additional targets of HBZ likely contributing to the disturbance of gene expression in HTLV-1-infected cells (Reinke et al., 2010; Zhao et al., 2008). A number of reports have also demonstrated that HBZ was expressed in cells from ATLL patients and that it could therefore be implicated in ATLL development, partly through its hyperproliferative action on T cells (Arnold et al., 2008; Barbeau and Mesnard, 2007; Matsuoka and Jeang, 2007; Mesnard et al., 2006; Satou et al., 2006).

Antisense transcription has been suggested in other retroviruses (Arnold et al., 2008; Briquet et al., 2001; Briquet and Vaquero, 2002; Michael et al., 1994a; Peeters et al., 1996; Tagieva and Vaquero, 1997; Vanhee-Brossollet et al., 1995). Importantly, we have recently demonstrated the existence of antisense transcription in the HTLV-2 virus and that the resulting encoded APH-2 shared a Tax-inhibiting activity alike HBZ (Halin et al., 2009). In light of this recent result and given that former studies have alluded to the possible existence of antisense transcription in HTLV-3 and HTLV-4, we have herein investigated on the presence of antisense transcripts in these viruses and on their potential encoding capacity. Our results indicate that both viruses produce a spliced and polyadenylated antisense transcript. The encoded proteins show distinct localization, the HTLV-3 antisense protein being both nuclear and cytoplasmic, while the HTLV-4 counterpart being almost exclusively contained in the nucleus. However, both antisense proteins were shown to inhibit Tax-

mediated HTLV LTR activation. These results hence provide important data indicating the potential essential role played by antisense proteins in retroviral replication.

2.2.3 Methods

2.2.3.1 Cell lines and antibodies

The human 293T and simian COS-7 kidney cell lines were maintained in DMEM medium supplemented with 10% foetal bovine serum (PAA Laboratories Inc., Toronto, Canada). The T-cell line Jurkat E6.1 was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum. The anti-Myc antibody (9E10) was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz CA), the ECL™ sheep anti-mouse IgG antibody coupled to the horseradish peroxidase was obtained from GE Healthcare Inc. (Buckinghamshire UK) and the goat anti-mouse IgG antibody coupled to the Alexa fluor 488 (A11001) was obtained from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, Canada). The anti-Tax polyclonal antibodies were kindly provided by Dr. Jean-Michel Mesnard (Université Montpellier I, Montpellier, France). The mouse anti-GAPDH antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc.

2.2.3.2 Plasmids

Both HTLV-3 (2026ND) and HTLV-4 (pUC-HT4v2) proviral DNAs were cloned in pUC18. The pHTLV-3 ΔEcoRV construct was derived from the HTLV-3 (2026ND) proviral DNA clone by EcoRV/XhoI digestion thereby deleting 4359pb of the 5' end of the proviral sequence. The pHTLV-3-as-luc vector was derived from pHTLV-3 ΔEcoRV by cloning the luciferase reporter gene from pGL3-basic in frame in the second exon of APH-3. Briefly, PacI and BstZ171 restriction sites were added to pHTLV-3 ΔEcoRV with the Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit using the reverse primer 5'-**ATAGTATACTGCAATCCCAGGAACTG**-3' (BstZ171 restriction site in bold) and

forward primer 5'-**ATATTAATTAAT**GTCTCCGGGGCTAGG-3' (PacI restriction site in bold). The luciferase reporter gene was amplified using reverse primer 5'-**ATATTAATTAAGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAA**-3' (PacI restriction site in bold) and forward primer 5'-**ATAGTATACT**ACCACATTTGTAGAGGTTTTAG-3' (BstZ171 restriction site in bold). Luciferase amplicons were ligated in the pHTLV-3 Δ EcoRV digested vector resulting in the pHTLV-3-as-luc. The pHTLV-4 Δ SacI construct was derived from HTLV-4 (pUC-HT4v2) proviral DNA by SacI/HindIII digestion, thereby deleting 3213bp of the 5' end of the proviral sequence. The pHTLV-4-as-luc vector was obtained by cloning the luciferase gene in frame in the second exon of APH-4 at position 7037 (sense transcript) in pHTLV-4 Δ 6560 (construct containing the last 2183bp of the HTLV-4 genome in the pUC18 vector) as described above by amplification of the luciferase gene with reverse primer 5'-**ATAGTATACAGAGGAGATGCCTGGTA**-3' and forward primer 5'-**ATATTAATTAATGGTGTGAGACCTTCTTTG**-3'. The pHTLV-1 luc vector contains the HTLV-1 LTR 3' region cloned into the XhoI/HindIII sites of the pGL2-Basic vector (Promega) (Geleziunas et al., 1998). The Tax1-expressing vector has been previously described (Matsumoto et al., 1997). The pCMV-Tax3 vector contains the Tax3-coding region under the control of the CMV promoter region in pcDNA3.1Zeo (+). The pMycAPH-3 and pMycAPH-4 expression vectors were generated by PCR amplification of the coding regions of APH-3 and APH-4 using primers that contains a Myc tag. Briefly, APH-3 was amplified using the reverse primer 5'-**ATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGGCTCGATCCCGAAGCGG**-3', the Myc tag being shown in bold and the forward primer 5'-**ATATCTAGATTATAACAGATCTGCTACCTCCTGTAG**-3' (XbaI restriction site in bold). APH-4 was amplified using the reverse primer 5'-**ATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGGACACTCGAGAATTTTTTAGGGG**-3' (Myc tag in bold) and forward primer 5'-**ATATCTAGATTATAATAACTCCGCCAATACACCCAAC**-3' (XbaI restriction site in bold). Amplified products were digested by XbaI and ligated into pcDNA3.1Zeo (+) digested by XbaI/EcoRV. pAPH-3-GFP and pAPH-4-GFP were generated by first amplifying APH-3 using the forward primer 5'-**ATAGAATTCATGGCTCGATCCCGAAGCGG**-3' (EcoRI restriction site in bold) and the

reverse primer 5'-ATA**ACCGGT**GTCTAACAGATCTGCTACCTCCTGTAG-3' (AgeI restriction site in bold) and APH-4 using the forward primer 5'-ATAGA**AATTC**ATGGACACTCGAGAATTTTTTAGGGG-3' (EcoRI restriction site in bold) and the reverse primer 5'-ATA**ACCGGT**GTCTAATAACTCCGCCAATACACCCAACA-3' (AgeI restriction site in bold). Amplified products were ligated into EcoRI/AgeI-digested peGFP-N1. To minimize synthesis of free GFP, the methionine initiation codon from the GFP reporter gene was mutated to a leucine (TTG) using the PhusionTM Site-Directed Mutagenesis Kit for both APH-3-GFP and APH-4-GFP constructs. The forward and reverse primers for APH-3-GFP were 5'-GCAGATCTGTTATTGGTGAGCAAGG-3' and 5'-TACCTCCTGTAGCAGGAGGCTAT-3'. As for APH-4-GFP, the forward and reverse primers were 5'-CGGAGTTATTATTGGTGAGCAAGGG-3' and 5'-CCAATACACCCAACAGGTCCC-3'. The HBZ-mRFP construct was generated by amplifying the HBZ SP1 cDNA with the forward primer 5'-ATA**AGCTT**ATGGCGGCCTCAGG-3' (HindIII restriction site in bold) and the reverse primer 5'-ATGA**ATTCT**TGCAACCACATCGCCT-3' (EcoRI restriction site in bold). The amplified products were then digested and ligated into pcDNA3.1Zeo(+)-mRFP (kindly provided by Dr. Matthew Weitzman, The Salk Institute, La Jolla CA). The nucleolin-dsRed expression vector has been previously described and expresses the chimeric form of nucleolin (Gomez Corredor and Archambault, 2009). The pRcActin-LacZ vector contains the β -galactosidase gene under the regulation of the β -actin promoter. An expression vector encoding the former unspliced HBZ isoform tagged with the Myc epitope was obtained from Dr. Jean-Michel Mesnard (Thebault et al., 2004). The HBZ exon 1 sequence in this vector was modified for HBZ SP1 exon 1 by reverse PCR using the forward and reverse primers 5'-ATGGCGGCCTCAGGGCTGTTTCGATGCTTGCCTG-3' and 5'-GGGGATCCACTAGTCCAGTGTG-3'. The resulting vector was termed pHBZ-SP1-Myc. From this plasmid, pAPH-3Myc and pAPH-4Myc expression vectors were generated by excising the HBZ cDNA with EcoRI and HindIII restriction enzymes and cloning APH-3 and APH-4 cDNAs amplified with EcoRI- and HindIII-containing primers.

2.2.3.3 RT-PCR

Total RNA was extracted by the TRIzol reagent (Invitrogen) from 293T cells at 48 h post-transfection. PolyA⁺ RNA was purified from total RNA using Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Canada) according to manufacturer's instructions. RT-PCR analyses were conducted using an oligo(dT) primer (Invitrogen). Briefly, total RNA (5mg) was mixed with 1ml of 10mM of the oligo(dT) primer. The RNA:RT primer mix was heated at 70° and incubated 2 h at 42°C in the presence of 1X AMV reaction buffer, 1 mM dNTPs, 10U of SUPERase-In RNase inhibitor (Ambion) and 15 U AMV reverse transcriptase (USB). Synthesized cDNAs were PCR amplified with the reverse primer 23-1 (5'-CCACCAAATAGAAGAGGGATGGC-3') and the forward primer 19-1 (5'-GACGCCCTGGCCCCAACAG-3') for the amplification of the antisense transcript of HTLV-3 and the reverse primer 21-1 (5'-CGGCGGCGTCTCAACTGATTG-3') and the forward primer 23-4 (5'-ACGAGTCCCCCATATGTCCAAA-3') for the amplification of the antisense transcript of HTLV-4. PCR conditions were as followed: a first step of denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 1 min), annealing (60°C for 1 min) and extension (72°C for 1 min) and a final extension at 72°C for 5 min.

2.2.3.4 5' and 3' RACE analyses

Total RNA was isolated with the RNA extraction Kit (Qiagen) from 293T cells at 48 h post-transfection. The initiation sites of the APH-3 and APH-4 transcripts were then determined using the FirstChoice RLM-RACE kit from Ambion according to manufacturer's instructions. cDNA synthesis was first performed in the presence of the supplied 5'RACE adapter. PCR amplification was achieved through 5'RACE outer and inner primers and different primers derived from the sequence of the ORFs: H3race-em-1 (5'-GCCATTCCCCTGAAGCATGTC-3') and H3race-em-2 (5'-GCTCCTCTGCAGTCAACACCG-3') for the HTLV-3 antisense transcript and 5RACEH4-1 (5'-GTCTGTTCCAAGCCAGCTGATAACCGAAAT-3') and 5RACEH4-2 (5'-

CTCCTAAGTTATGGTTACATTCCTCCTCCAG3') for the HTLV-4 antisense transcripts. Amplified products were then cloned in the pDrive vector and sequenced.

The polyA signals were identified from isolated polyA⁺ RNA again using the FirstChoice RLM-RACE kit. cDNA synthesis was performed in the presence of the supplied 3'RACE adapter. PCR amplifications were achieved through 3'RACE outer and inner primers and a primer derived from the sequence downstream of the ORFs: 23-2 (5'-GGAGAGGAACCACACTGGATCAT-3') for the HTLV-3 antisense transcript and 23-5 (5'-GAGTCAGGACATGCTCTAGGTCT-3') for the HTLV-4 antisense transcript. Amplified products were then cloned in SmaI-digested pBlueScript KS and sequenced.

All PCR conditions were performed according to manufacturer's instructions.

2.2.3.5 Transfection and promoter studies

293T cells were transfected with 10-15 mg of DNA using the calcium phosphate protocol as previously described (Fortin et al., 1997) or using the LipofectamineTM Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Jurkat cells were transfected by electroporation with 15 mg of DNA using the Gene Pulser Xcell system (BioRad, Hercules, CA) (960mF, 250V). Transfected 293T cells were lysed 48h post-transfection in lysis buffer (25mM Tris phosphate, pH 7.8, 2mM DTT, 1% Triton X-100, 10% glycerol) and luciferase activity readout was performed with the MLX microplate luminometer (Dynex Technologies) as previously described (Barbeau et al., 2001). Each sample was co-transfected with pRcActin-LacZ for transfection efficiency. β -galactosidase activities were measured using the Galacto-LightTM kit (Applied Biosystems, Bedford, MS) according to manufacturer's protocol. Luciferase activity are presented in normalized Relative Light Units (RLU/ β -gal) and represent the calculated mean \pm SD of three transfected samples. For Jurkat transfection, cells were resuspended at 2.5×10^7 /ml of complete medium, transfected in bulk and separated at 16 h post-transfection into various treatment groups at a density of 1×10^5 cells/well (100ml) in 96-well flat-bottom plates. Cells were either left untreated or were treated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) at 20 ng/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), phytohemagglutinin (PHA-P) at 3 mg/ml (Sigma-Aldrich), ionomycin (Sigma-Aldrich) at 1

mM, bpV [pic] (Alexis Corporation, Lausen, Switzerland) at 15 mM, forskolin (Sigma-Aldrich) at 10 mM and TNF α (Sigma-Aldrich) at 20 ng/ml. Luciferase activity was monitored at 8 h post-stimulation.

2.2.3.6 Confocal microscopy

Cells were seeded in 6 well plates containing a 1.5mm thick coverslip for 24 h before transfection and were then transfected using the LipofectamineTM Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. At 36 h post-transfection, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature. Cells were then washed 3 times with PBS and incubated with anti-Myc 9E10 (dilution 1:400) for 1 h at room temperature. Samples were next washed 3 times with PBS and incubated with a goat anti-mouse IgG antibody coupled to Alexa fluor 488 for 45 min at room temperature and washed again with PBS. Cells were incubated in a 2.5 mg/ml propidium iodide (PI) solution. The coverslip were then mounted in a drop of ProLong Antifade (Invitrogen). For live cell imaging, cells were cultured onto Lab-Tek Chambered Coverglass (Thermo Fisher Scientific, Rochester NY) for 24 h before transfection and were then transfected using the LipofectamineTM Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Cells were observed 36 h and 48 h post-transfection. Images were acquired with a MRC1024 confocal laser-scanning microscope (BioRad, Hercules, CA).

2.2.3.7 Western blot analysis

Total extracts were prepared as previously described (Vargas et al., 2009). Cytoplasmic and nuclear extracts from transfected 293T cells were prepared using NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Equal quantities of extracts were run on a SDS-10% PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore, Mississauga, Canada). The blot was next blocked in PBS/5% milk and incubated with either anti-Myc 9E10 (1:1000), an anti-Tax antibody (1:100) or anti-GAPDH (1:1000). After several washes, signals were revealed by

the addition of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (dilution 1:10000) antibody and subsequent incubation with the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN). Membranes were exposed on Amersham hyperfilms ECL (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK). For the detection of Tax, the SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer kit was used to amplify the signal according to manufacturer's instructions (EMD Bioscience, San Diego CA).

2.2.4 Results

2.2.4.1 Detection of spliced antisense transcripts from HTLV-3 and HTLV-4

Previous studies have highlighted the presence of a potential ORF in the antisense strand of HTLV-3 (Calattini et al., 2006; Chevalier et al., 2008; Switzer et al., 2006). Given that the existence of antisense proteins has been demonstrated for HTLV-1 and HTLV-2, we thereby asked whether both newly discovered HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses could express similar antisense proteins. Our first *in silico* analysis of the ORF present in both HTLV-3 and HTLV-4 proviral DNA (Switzer et al., 2006; Wolfe et al., 2005) indeed revealed the existence of an ORF in the antisense strand between both *tax* and *env* genes (Figure 2.1A and B). The encoded protein was predicted to contain a maximum of 221 and 158 amino acids for HTLV-3 and HTLV-4 respectively. These ORFs were termed APH (Antisense Protein of HTLV)-3 and APH-4.

To directly address the existence of antisense transcripts in these retroviruses, we first conducted RT-PCR analyses. Each proviral DNA constructs were deleted of their 5' LTR region to minimize interference from sense transcription (Figure 2.1). The resulting pHTLV-3 Δ EcoRV and pHTLV-4 Δ SacI proviral DNA constructs were then transfected in 293T cells and analysed using forward and reverse primers derived from the 3' LTR and APH-3/APH-4 regions, respectively (Figure 2.2). The choice of primers and their positioning were based on the previously described spliced pattern of the antisense HBZ transcript of the related HTLV-1 virus (Cavanagh et al., 2006; Murata et al., 2006; Satou et al., 2006). RT-PCR analyses indeed revealed the presence of a single signal specific for an antisense transcript (Figure 2.2A and B). In addition, their size also lend credence to the occurrence of splicing while no signals with a size expected for unspliced transcripts were amplified. Splice sites of the HTLV-3 antisense transcript were positioned at nt 8556 and 7218 for the splice donor (SD) and splice acceptor (SA), respectively, while their corresponding SD and SA sites were at nt 8422 and 7089 for the HTLV-4 antisense transcript. Position of the spliced sites and the length of the intronic region were well conserved between HTLV-3 and HTLV-4. Similar to the HTLV-1 HBZ protein, in both *APH-3* and *APH-4* transcripts, the resulting spliced transcripts led to the addition of an N-terminal amino acid sequence with a methionine

initiation codon derived from exon 1 located in the 3' LTR to the remaining corresponding ORF sequence (Figure 2.2C). For APH-3, a total of 9 amino acids were added from exon 1 while APH-4 exon 1 was responsible for the addition of 4 amino acids. An important observation is that unlike HBZ, if the unspliced mRNA might encode for a different APH isoform, in both cases, the resulting encoded APH isoform would initiate at a position downstream of the splice acceptor site thereby leading to a shorter isoform than the protein potentially encoded from spliced transcripts.

These results hence demonstrated that both viruses were capable of producing a spliced antisense transcript with a potential to encode for a protein. Signals corresponding to an unspliced transcript were not detected in these analyses.

2.2.4.2 *APH-3* and *APH-4* transcripts have multiple initiation sites and are polyadenylated

To more precisely characterize *APH-3* and *APH-4* transcripts, we performed 5'RACE analyses (Figure 2.3). Total RNA was thus isolated from 293T cells transfected with proviral DNA-deleted versions (for HTLV-3, nt. 4731 to 8918 and for HTLV-4, nt. 4873 to 8742), each minimally containing the 3' LTR and the presumed antisense ORF. Based on our 5' RACE analyses, 4 different initiation sites were detected for *APH-3* transcripts (Figure 2.3A), while 5'RACE analyses of *APH-4* transcripts showed as many as 7 initiation sites located at the end of the 3' LTR (Figure 2.3B).

We were next interested in characterizing the 3' end of both retroviral antisense transcripts (Figure 2.3C and D). Again, proviral DNA-deleted versions of HTLV-3 and HTLV-4 were transfected in 293T cells and polyA⁺ RNA were used to identify the 3' end of the transcripts by 3' RACE analysis. As depicted in Figure 2.3C and D, both transcripts were cleaved and polyadenylated at a single site between a consensus polyA signal and a GU-rich sequence, which is often found in proximity to the polyA tail addition site. Interestingly, although the composition of the targeted dinucleotide for cleavage was different for both retroviruses (AG and CC for HTLV-3 and HTLV-4, respectively), they occurred at an equal

distance from the polyA signal (19 nt.). Based on the overall position of transcription initiation sites and polyA addition sites, the size of the *APH-3* and *APH-4* transcripts were evaluated to be of 2.4 kb and 2.3 kb, respectively.

2.2.4.3 Cellular localization of both APH-3 and APH-4

The resulting amino acid sequence of APH-3 and APH-4 was compared to the previously published HBZ and APH-2 sequence (Figure 2.4). This comparison revealed that the described bZIP domain of HBZ was not conserved among both APH-3 and APH-4. Basic-rich regions were however noted at similar positions to formerly identified BR regions of HBZ (Hivin et al., 2005) and could reflect potential NLS sequence for both APH-3 and APH-4. In addition, LXXLL and LXXLL-like motifs known to be responsible for an interaction of HBZ with CBP/p300 (Clerc et al., 2008) were identified in both APH-3 and APH-4 proteins.

Based on these analyses, we next determined the cellular localization of APH-3 and APH-4 using expression vectors for both proteins tagged with a Myc epitope at their amino ends. These vectors were transfected in COS-7 cells and analyzed by confocal microscopy. In these analyses, APH-3 mainly localized in the nucleus but showed significant staining in the cytoplasm (Figure 2.5A). Similar staining was also noted in transfected 293T cells (data not shown). Analyses were conducted on 293T cells transfected with the Myc-tagged APH-4 expression vector. Interestingly, more reminiscent of HBZ, APH-4 was strictly present in the nucleus. These confocal microscopy experiments were also tested on cells transfected with COOH-tagged APH expression vectors and again led to similar results (data not shown), indicating that the added tag and its position likely did not contribute to the cellular distribution of APH-3 and APH-4.

To further analyze the cellular localization of APH-3 and APH-4, live cell imaging experiments were conducted in COS-7 cells transiently transfected with either APH-3-GFP or APH-4-GFP expression vectors. As illustrated in Figure 5B, the APH-3-GFP fusion protein localized to the nucleus and partially to the cytoplasm at 48 h post-transfection whereas the

APH-4-GFP fusion protein was strictly localized to the nucleus. Hence, cellular localization of these fusion proteins followed the same trend as with the Myc tag constructs. Transfection experiments in 293T cells demonstrated similar results (data not shown). We also verified if APH-3 and APH-4 had a nucleolar localization (Figure 2.5C). We thus transiently co-transfected APH-3-GFP or APH-4-GFP expression vectors with a nucleolin-dsRed-expressing plasmid. Cells were observed by confocal microscopy 48 h post-transfection and confirmed that some of the signals specific for both APH-3 and APH-4 demonstrated a nucleolar localization.

To confirm the cellular distribution of both APH-3 and APH-4, Western blot analyses were performed on nuclear and cytoplasmic extracts prepared from 293T cells transfected with expression vectors for Myc-tagged HBZ, APH-3 or APH-4 (Figure 2.5D). Controls consisted of extracts from cells transfected with the empty expression vector. Extracts indeed revealed the expected size for APH-3 (28 kDa) while APH-4 indicated a lower molecular weight than the predicted size, being 22 kDa. Previous reports (Arnold et al., 2006; Cavanagh et al., 2006) have also highlighted that HBZ demonstrated a migration differing from its expected size of 27 kDa. As predicted, both APH-4 and HBZ were mainly present in nuclear extracts while showing a more modest signal in cytoplasmic extracts. On the other hand, the APH-3 signal was present in both extracts, although it was present at higher levels in the nucleus. Interestingly, a higher molecular weight signal was apparent almost exclusively in the nucleus of APH-3-expressing cells.

Together, these results support cellular localization shared between HBZ, APH-3 and APH-4. In terms of localization, APH-4 had an almost identical distribution to HBZ whereas APH-3, even though partially cytoplasmic, nonetheless resembled to HBZ in terms of its nuclear signals.

2.2.4.4 Partial co-localization between HBZ and APH-3 and APH-4

As APH-3 and APH-4 present certain similarities with HBZ, cellular localization of these proteins were thus directly compared. COS-7 cells were transiently co-transfected with APH-3-GFP or APH-4-GFP expression vectors along with an HBZ SP1mRFP expression

vector and analyzed 48 h post-transfection (Figure 2.6B and 2.6C). The majority of the punctuated structures of both APH-3 and APH-4 fusion proteins co-localized with HBZ-mRFP in the nucleus, although certain speckled structures were differently positioned from HBZ as determined by the merging of both signals. As expected, the cytoplasmic signals observed in APH-3-GFP-expressing cells did not co-localize with HBZ (Figure 2.6B). As a control, free GFP and free mRFP were expressed in COS-7 cells and presented homogenous signals different from the signals seen with the antisense GFP fusion proteins (Figure 2.6A).

2.2.4.5 Promoter studies on both HTLV-3 and HTLV-4 antisense transcripts

To further characterize *APH-3* and *APH-4* gene expression, promoter activity was analysed in Jurkat cells using constructs in which a luciferase reporter gene along with a polyA signal was inserted in frame with the amino acid sequence present in exon 2 of both APH-3 and APH-4 (Figure 2.7A). Jurkat cells were subsequently transfected and then either left untreated or stimulated with a series of known T-cell activators. In non-stimulated conditions, luciferase activity was found to be modest but significant showing no strong differences between HTLV-3 and HTLV-4 constructs (data not shown). Stimulation also led to an increase in luciferase activity for both vectors and both promoters tended to be more responsive to the addition of the PTP inhibitor, bpV[pic], a strong T-cell activating agent (Figure 2.7B). Fold inductions nonetheless remained modest.

2.2.4.6 Tax-driven HTLV LTR activation is inhibited by APH-3 and APH-4 expression and is dose-dependent

Former studies have demonstrated that the HTLV-I-encoded HBZ protein inhibited Tax-mediated activation of LTR-driven sense expression. In addition, this inhibition was mediated (at least partially) by direct interaction with CREB-2 through its leucine zipper domain. As APH-3 and APH-4 seems to lack such a domain, we tested whether these two

viral proteins could nonetheless act upon Tax-mediated HTLV-1 LTR activation (Figure 2.8A). Two different doses of the HBZ, APH-3 or APH-4 expression vectors were transfected in 293T cells along with pHTLV-1 Luc and a Tax1 expression vector. Results indicated that both APH-3 and APH-4 could block HTLV-1 LTR transactivation by Tax1 as potently as HBZ. The analysis further demonstrated that higher levels of the APH-3 or APH-4 expression vectors led to more pronounced inhibition of Tax1-mediated HTLV-1 LTR transactivation. To verify that these HTLV-1 LTR repressions were not due to reduced Tax1 expression mediated by inhibition of the CMV promoter itself in the expression vector, Western blot analyses were performed on cell lysates prepared from 293T cells similarly transfected as above. Tax1 levels were generally stable in all conditions, although variations were observed among the samples. The intensity of the GAPDH signal was also overall comparable.

We next wanted to determine whether all three antisense proteins had an inhibitory effect on the Tax protein from another HTLV virus. Hence, expression vectors for APH-3, APH-4 and HBZ were transfected in 293T cells along with expression vectors for Tax1 or Tax3 and pHTLV-1 luc (Figure 2.8B and 2.8C). Measurement of normalized luciferase activity demonstrated that HBZ blocked Tax1 and Tax3 activation of the HTLV-1 LTR. Similarly, both APH-3 and APH-4 showed a capacity to block HTLV-1 LTR upregulation mediated by either Tax1 or Tax3.

These results therefore indicated that, although APH-3 and APH-4 lack a typical bZIP domain, both proteins can alter the extent of activation of the HTLV-1 LTR mediated by either Tax1 or Tax3 and could therefore play a similar role in HTLV-3 and HTLV-4 replication.

2.2.5 Discussion

HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses have been recently isolated from Cameroon individuals, which showed no sign of illness (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005). Studies have further demonstrated that a number of retroviral genes are shared with the related HTLV-1 and HTLV-2 viruses (Calattini et al., 2006; Chevalier et al., 2006; Wolfe et al., 2005). Given that recent evidence points to the importance of the newly discovered antisense-encoded HBZ gene in both HTLV-1 replication and ATLL development, the goal of this study was to provide evidence for the existence of antisense transcripts in these viruses and to further assess the possible functional relevance of their encoded proteins.

Our *in silico* analyses confirmed previous reports in that a potential ORF was indeed present on the antisense strand of the HTLV-3 and HTLV-4 genomes. Our analyses have indeed demonstrated that these proteins seemed devoid of a classical bZIP domain but contained a certain number of basic-rich regions similar to basic regions identified for HBZ. Although these basic amino acid-rich regions could serve in targeting APH-3 and APH-4 to the nucleus, these domains could also participate in modulating the transcriptional modulation of APH-3 and APH-4.

Our RT-PCR analyses and 3' RACE experiments have conclusively indicated that the antisense transcripts of HTLV-3 and HTLV-4 are spliced and polyadenylated. The splicing pattern was similar to that of HBZ with a similar intronic size. Although more analyses are needed, current results argue for low abundance of unspliced transcripts and therefore suggest that no other isoform could be produced from the antisense transcript. In addition, unlike HBZ, translation of APH-3 and APH-4 would initiate with a methionine resulting in the deletion of 15 and 24 amino acids from the NH₂ end, respectively. Such deletions might cause important changes in the protein and might suggest why unspliced transcripts are not abundant and therefore do not lead to synthesis of another isoform. Analyses of the SD and SA sequence have revealed typical consensus sequence. Consensus polyA signal and GU-rich sequences were also identified in proximity to the polyA addition site for both HTLV-3 and HTLV-4. This is again reminiscent of the situation of the HBZ transcript. In fact

positioning of the polyA addition site for *APH-3* and *APH-4* RNA is equivalent to the *HBZ* gene and likely reveals specific constraints associated with antisense transcription.

The analysis of the amino acid composition of both *APH-3* and *APH-4* and their comparison to *HBZ* demonstrated important differences. First and importantly, software analysis of *APH-3* and *APH-4* did not highlight a LZ domain, a marked difference with *HBZ*. In addition, *APH-3* showed important differences in amino acid sequence. However, it should be stressed that like *HBZ*, basic regions were identified and LXXLL and LXXLL-like motifs (known to be responsible for binding p300/CBP) were also noted. These similarities might indeed contribute to the similarity in cellular localisation and functional aspects between *APH-3*, *APH-4* and *HBZ*. Confocal and Western blot experiments have indeed indicated that *APH-3* and *APH-4* are both nuclear (at least partly for *APH-3*). The NLS sequence, which mediates nuclear targeting, remains however to be determined but might reasonably involve similar regions to those responsible for nuclear localisation of *HBZ*. Furthermore, like *HBZ*, both *APH-3* and *APH-4* co-localized with the nucleolus.

Another interesting observation is the cytoplasmic localization of *APH-3* observed in both 293T and COS-7 cells. This observation might be indicative of the existence of a potential nuclear export signal. It is also important to note that a higher molecular weight signal was noted in our Western blot analysis in *APH-3*-expressing cells and that this signal was mainly localised to the nucleus. This opens up the possibility that nuclear localisation for *APH-3* (and even for *HBZ* and *APH-4*) could be importantly modulated by potential post-translational modifications, such as phosphorylation or sumoylation. Interestingly, the viral Tax protein has been previously shown to be altered in its nuclear distribution by sumoylation events (Lamsoul et al., 2005). Further experiments will be required to assess if this is indeed the case for HTLV-derived antisense proteins.

Studies of the *APH-3* and *APH-4* promoters using the luciferase reporter gene have further showed that their expression was stimulated by known T-cell activators, albeit weakly. Similar results have been obtained with constructs for the *HBZ* gene. It might be expected that, as for *HBZ* expression, Tax expression would induce its expression *via* the equivalent TRE sequences present in the U3 region (Landry et al., 2008; Yoshida et al., 2008) and current experiments are addressing this possibility.

Functional analyses have been investigated for both APH-3 and APH-4. HTLV-1 LTR has been previously shown to also be activated by Tax3 (Calattini et al., 2006). Our analyses have revealed that both antisense proteins could indeed inhibit Tax1- and Tax3-mediated HTLV-1 LTR activation. This raises the issue, as we have previously demonstrated, that the leucine zipper domain is not the only amino acid segment responsible for Tax inhibition by HBZ (Clerc et al., 2008). Amino acid sequence of both APH-3 and APH-4 highlights possible LXXLL and LXXLL-like motifs, which are known to mediate interaction with p300/CBP and are related to the interaction of HBZ and p300/CBP. Hence, the mechanism of Tax inhibition is likely different from HBZ and should further be considered in the context of the differences in cellular distribution of the different antisense proteins. These differences could also impact on cellular genes modulated differently by HBZ, APH-3 and APH-4 and might affect their capacity to modify cellular proliferation and/or transformation.

The current data demonstrate that antisense transcription is a common mode of expression in HTLV viruses (and likely STLV family members). Recent results have also confirmed that a similar antisense transcript and encoded protein was being produced from the HTLV-2 virus (Halin et al., 2009), a virus which has not been related to any haematological malignancies. The similarity between these transcription patterns and the function of their encoded proteins highlight the importance of antisense-encoded HTLV gene for replication. Furthermore, a link between HBZ and ATLL development has been suggested. It is not currently known if HTLV-3 and HTLV-4 are also associated with human diseases and future studies will help in assessing this possibility as well as the possible association of viral proteins (including APH-3 and APH-4). In addition, it will be interesting to determine if other human and non-human retroviruses might also be capable of producing antisense transcripts with an encoding capacity.

2.2.6 Acknowledgments

This work was supported by a grant to B.B. from The Cancer Research Society (CRS) Inc. M.H. was supported by an institutional Hydro-Quebec scholarship and S.L. held a CIHR Ph.D. scholarship. B.B. holds a Canada Research Chair in human retrovirology (Tier 2). We are thankful toward Dr. David Derse for providing us with both HTLV-3 (2026ND) and HTLV-4 (pUC-HT4v2) proviral DNAs. We would also like to thank Denis Flipo for his excellent technical support for experiments related to confocal microscopy.

2.2.7 Figure legends

Figure 2.1. Position of the antisense ORF in the HTLV-3 and HTLV-4 genomes.

The HTLV-3 2026ND (A) and HTLV-4 HT4v2 (B) molecular clones are depicted with known genes. The positioning of the putative APH-3 and APH-4 ORF from the antisense strand is indicated below each proviral DNA. A 5' deleted version of these vectors termed pHTLV-3 Δ EcoRV and pHTLV-4 Δ SacI, respectively are also presented. The size of the proviral DNA (full length or 5' end deleted version) is indicated for each retrovirus.

Figure 2.2. Detection of spliced HTLV-3 and HTLV-4 antisense transcripts.

293T cells were transfected either with pHTLV-3 Δ EcoRV (A) or pHTLV-4 Δ SacI (B). RNA was extracted and analyzed by RT-PCR for the presence of antisense transcripts using the primer combinations 21-3/19-1 (A) or 21-1/23-3 (B). Deduced spliced transcripts for each proviral DNA are depicted and position of the SD and SA sites are indicated below (nucleotidic positioning from sense strand). Control (-) = no cDNA added in the PCR reaction; M= 100 bp marker (* 600 bp). C. Amino acid sequence deduced from spliced *APH-3* and *APH-4* RNA next to the spliced junction. The amino acid is shown above each sequence. As a reference, the nucleotidic and amino acid sequences predicted for unspliced transcripts are also provided for comparison. Asterisks represent in frame stop codons.

Figure 2.3. Identification of transcription initiation sites and poly A addition sites for *APH-3* and *APH-4* transcripts.

Cultured 293T cells were transfected with proviral DNA-deleted versions of either pHTLV-3 (nt 4731 to 8918 containing the 3' LTR and the antisense ORF) (A, C) or pHTLV-4 (nt 4873 to 8742 containing the 3' LTR and the antisense ORF) (B, D). RNA was extracted 48 h post-transfection and analyzed by 5' or 3' RLM-RACE. In panels A and B, the antisense nucleotide sequence of the 3' LTR is depicted and initiation sites are shown by broken arrows. In panels C and D, sequence of the *APH-3* and *APH-4* mRNA and of both 3' poly A

tail are shown. In the sequence below, the position of the cleavage site and the presence of both polyA signal and GU-rich sequence are highlighted. Lane (-): PCR amplification in the absence of any cDNA. M= 100 bp marker (* 600 bp).

Figure 2.4. Amino acid sequence of the predicted APH-3 and APH-4 proteins.

The amino acid sequence of APH-3 and APH-4 were deduced from the 2026ND (HTLV-3) and HT4v2 (HTLV-4) strains, respectively. Both sequences were compared to the amino acid sequence of the HBZ-SP1 isoform and to the previously reported sequence of the HTLV-2-derived APH-2 antisense protein. The described BR2, BR1 and DNA-binding domain (DBD) are indicated above the HBZ sequence, while the LZ domain is displayed in a box. LXXLL and LXXLL-like motifs are underlined in both APH-3 and APH-4 amino acid sequences.

Figure 2.5. APH-3 and APH-4 demonstrate different cellular localizations.

pMycAPH-3 and pMycAPH-4 (A) expression vectors were transfected into COS-7 cells. Thirty-six hours post-transfection, cells were fixed and stained as described in Material and Methods. Cells were mounted in ProLong Antifade in the presence of propidium iodide. Images are representative of the entire population of transfected cells. Images on the right side of the panels are presented after merging of both Myc (green) and PI (red) signals. Samples were observed through the BioRad laser-scanning confocal microscope MRC-1024ES with a 60X objective under oil immersion and a numerical aperture of 1.4. Images were acquired with the LaserSharp software. **B.** The parental pGFP-N1, pAPH-3-GFP and pAPH-4-GFP expression vectors were transfected into COS-7 cells. Thirty-six hours post-transfection, cells were visualized by confocal microscopy. Images on the left column represent the GFP signal, the middle column shows phase contrast and the right column depicts merging of both phase contrast and the GFP signal. **C.** pAPH-3-GFP and pAPH-4-GFP expression vectors were co-transfected with pNucleolin-dsRed in COS-7 cells. Forty-eight hours post-transfection, cells were observed by confocal microscopy. Images on the left column represent the GFP signal (green), the middle column shows the dsRed signal and the right column presents merged GFP and dsRed signals. Samples were maintained in supplemented DMEM medium during observation. The BioRad laser-scanning confocal

microscope MRC-1024ES was used to visualize positive cells with a 20X objective under water immersion and a numerical aperture of 0.75. **D.** Cell lysates (50 mg) from 293T cells transfected with pHBZ-Myc, pMycAPH-3 or pMycAPH-4 were first separated in cytoplasmic (Cyt) and nuclear (Nuc) fractions and then subjected to electrophoresis on a 12 % Bis-Tris gel and analyzed by Western blot with an anti-Myc antibody. Cells transfected with the pcDNA3.1/Myc parental vector served as negative control (CTL). For APH-3, the asterisk points to the major signal with the expected size.

Figure 2.6. Partial colocalization of APH-3 and APH-4 with HBZ.

A. Parental vectors pGFP-N1 and pmRFP were transfected in COS-7 cells and visualized through confocal microscopy. **(B)** pAPH-3-GFP and pAPH-4-GFP **(C)** expression vectors were co-transfected with HBZ SP1mRFP into COS-7 cells. Forty-eight hours post-transfection, cells were observed by confocal microscopy. Images on the top represent the GFP signal (green), in the middle shows the mRFP signal (red) and at the bottom depicts merging of both GFP and mRFP signals. Samples were maintained in supplemented DMEM medium during observation. The BioRad laser-scanning confocal microscope MRC-1024ES was used to visualize positive cells with a 20X objective under water immersion and a numerical aperture of 0.75.

Figure 2.7. Antisense expression is upregulated in Jurkat T cells after activation.

(A) The firefly luciferase reporter gene was inserted in frame with the exon 2 of both APH-3 and APH-4 along with a polyA signal cassette at its 3'end generating pHTLV-3-as-luc and pHTLV-4-as-luc. **(B)** Both luciferase-encoding constructs were transfected in Jurkat T cells and were then activated for 8 h with PHA, PMA, ionomycin, bpV[pic], forskolin, TNF α or a combination of these agents. Luciferase activity was measured from cell lysates of three independently stimulated samples and is presented as the average fold induction (\pm S.D.) where a value of 1 is given to unstimulated cells. These results are representative of four independent experiments.

Figure 2.8. APH-3 and APH-4 repress Tax1- and Tax3-dependent transactivation of the HTLV-1 LTR.

A. 293T cells were transiently co-transfected with pHTLV-1 luc and pCMVTax1 together with 0.2 μ g or 0.4 μ g pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3 or pMycAPH-4 (compared to the empty vector pcDNA3.1) and pRcActin-lacZ. Cells were lysed 48 h post-transfection. Presented luciferase activities are an average of three independent transfection experiments and are depicted as the average normalized luciferase activity \pm S.D. These results are representative of three independent experiments. In the bottom panel, cells lysates (25 μ g) were prepared from these transfections and analyzed by Western blot using an anti-Tax serum or mouse anti-GAPDH. **B-C.** 293T cells were transiently transfected with pHTLV-1 luc and pCMVTax1 (**B**) or pCMVTax3 (**C**) together with pMycAPH-3, pMycAPH-4 or HBZ-SP1-Myc (compared to the empty vector pcDNA3.1) and pRcActin-lacZ. The presented luciferase activities are an average of three independent transfection experiments and are depicted as the average normalized luciferase activity \pm S.D. These results are representative of three independent experiments.

2.2.8 Figures

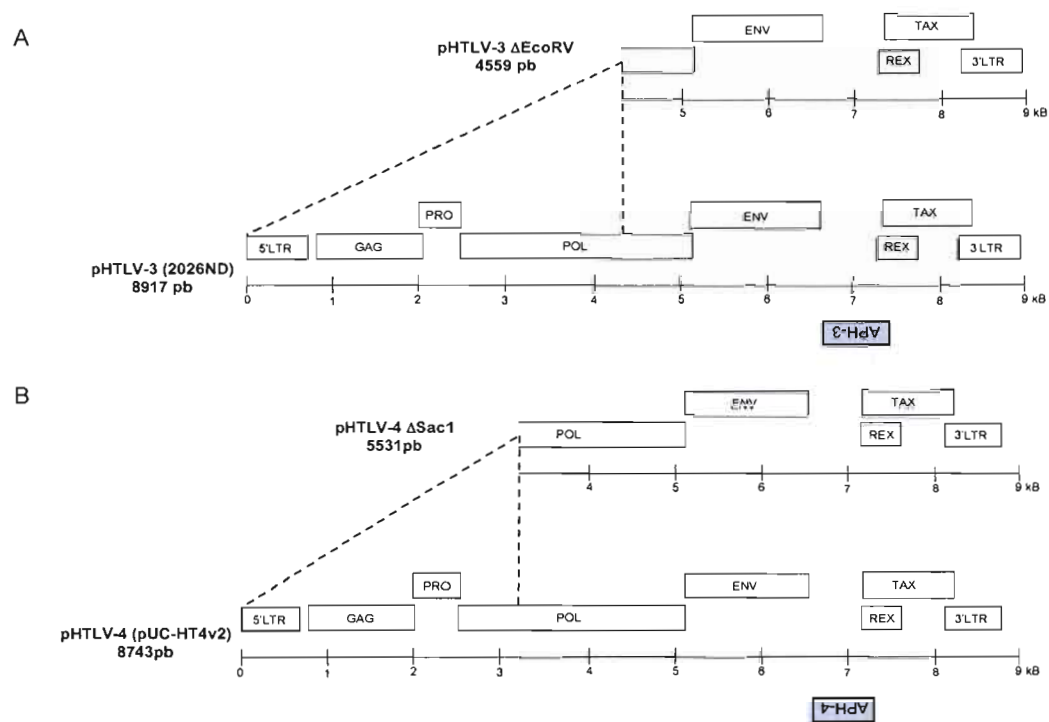


Figure 2.1

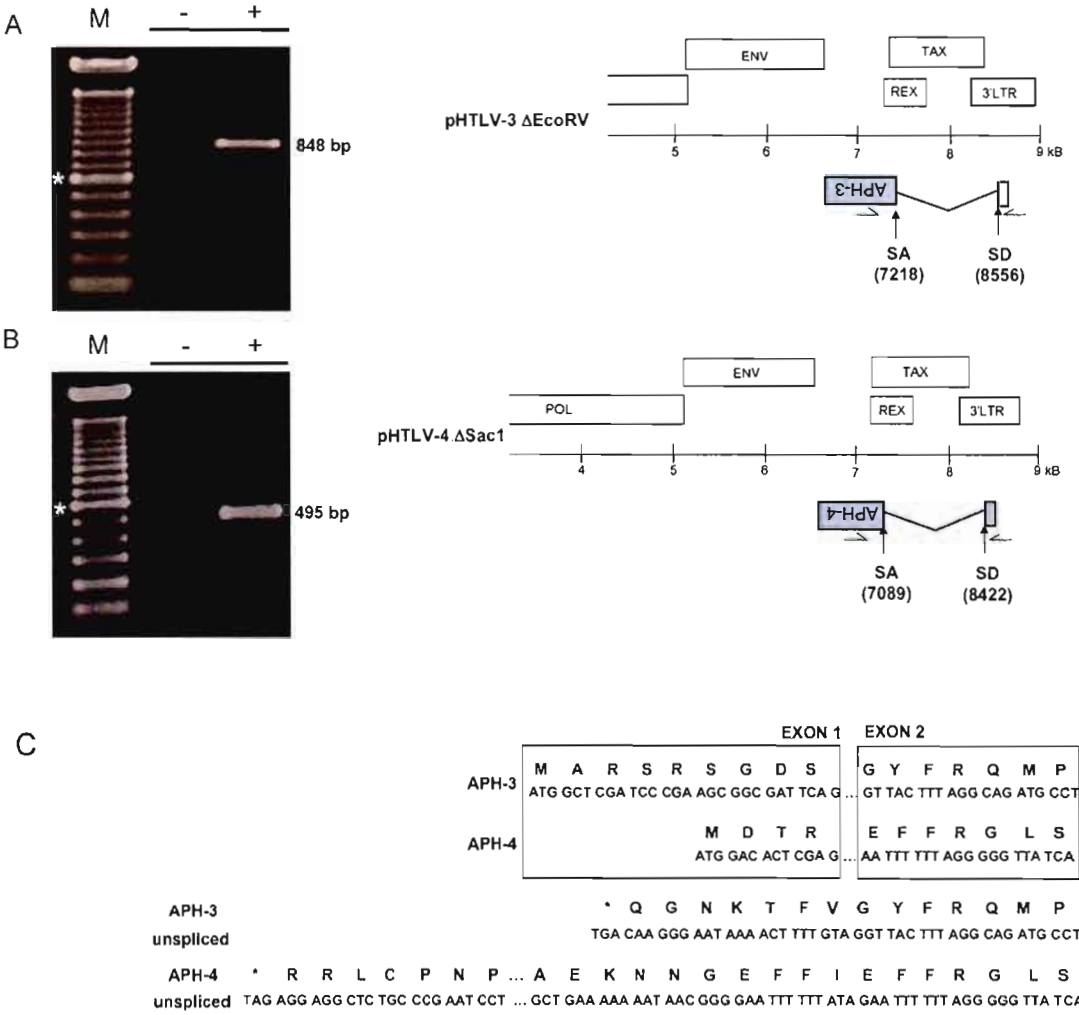
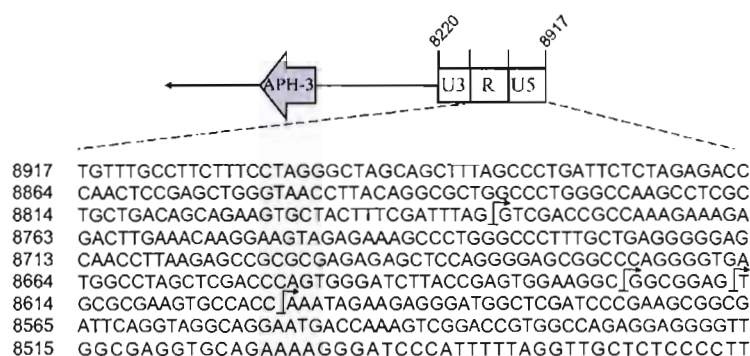


Figure 2.2

A



B

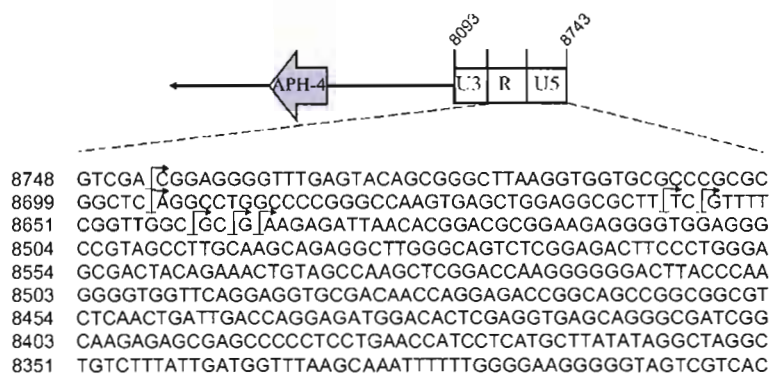


Figure 2.3

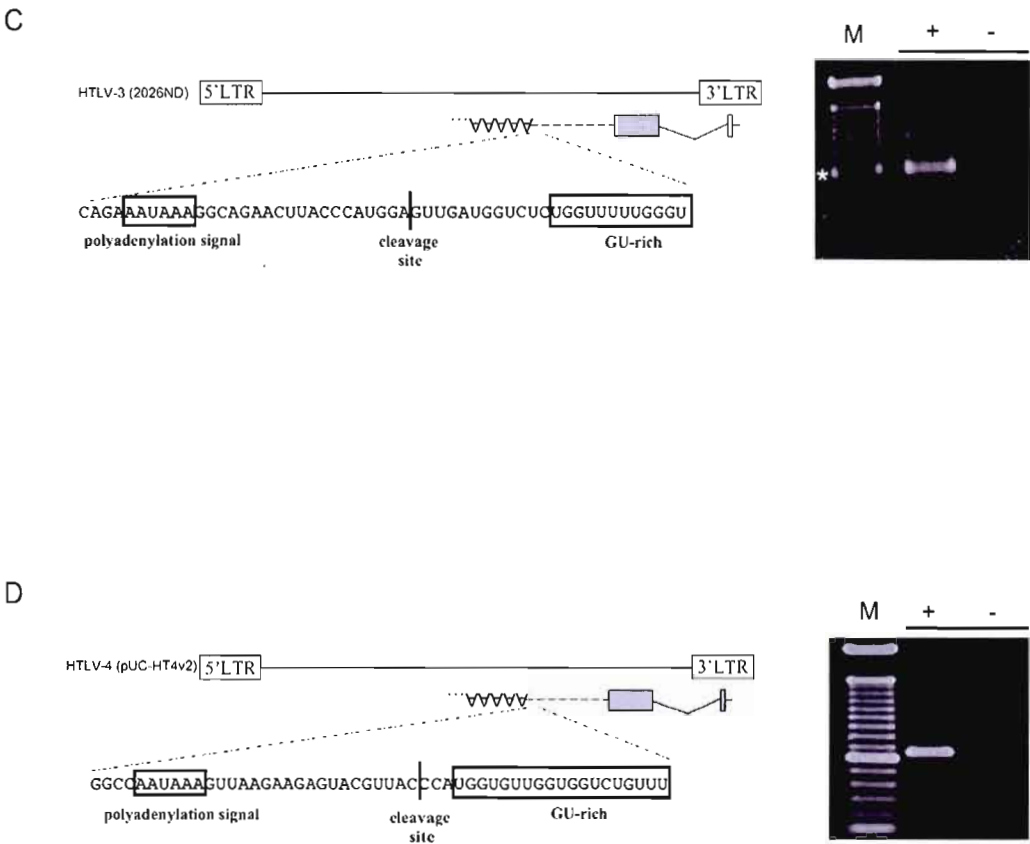


Figure 2.3

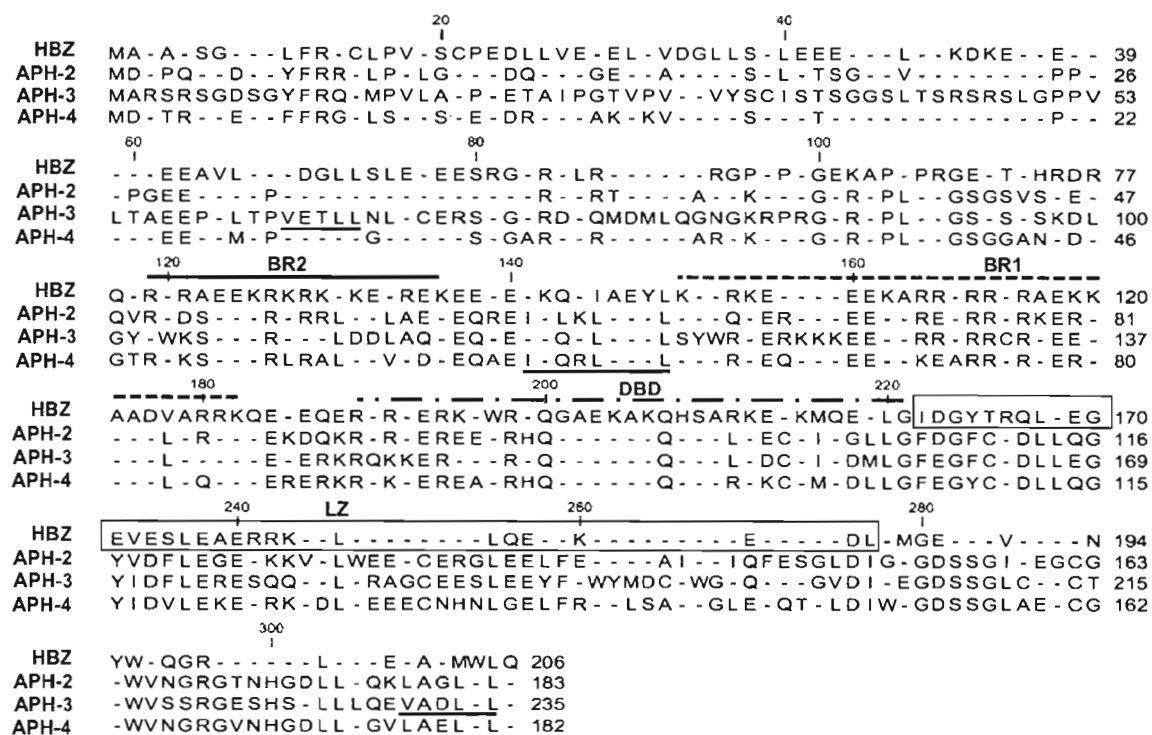


Figure 2.4

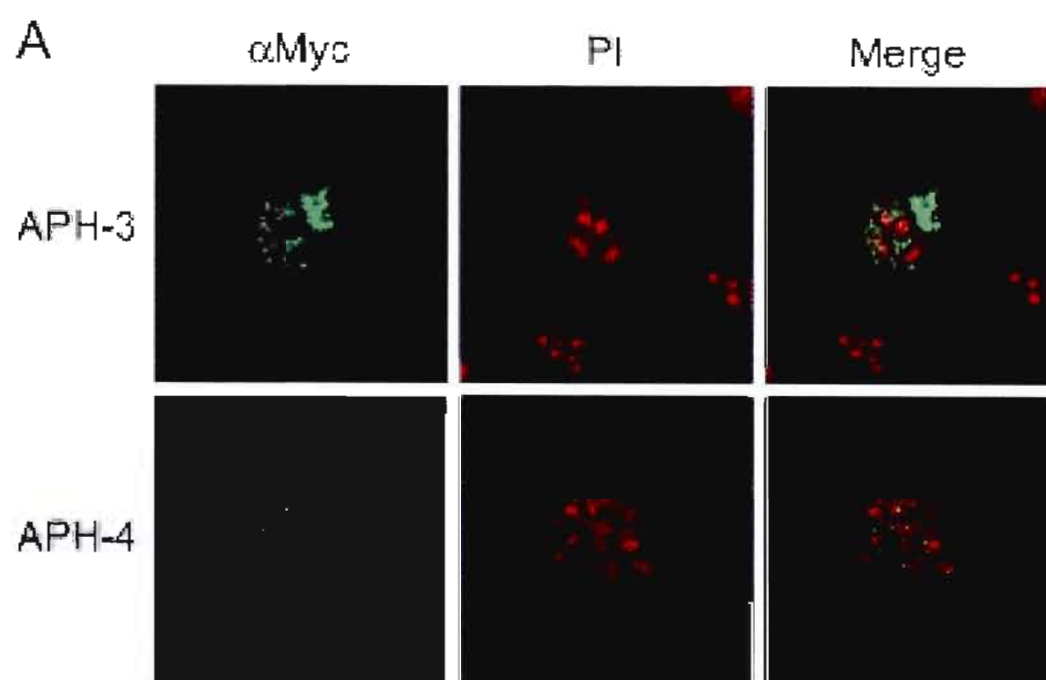


Figure 2.5

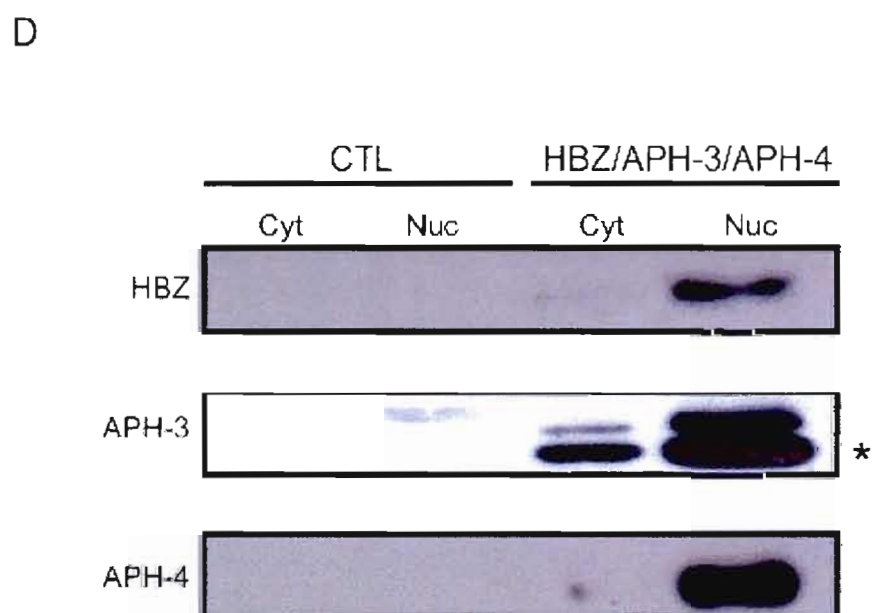
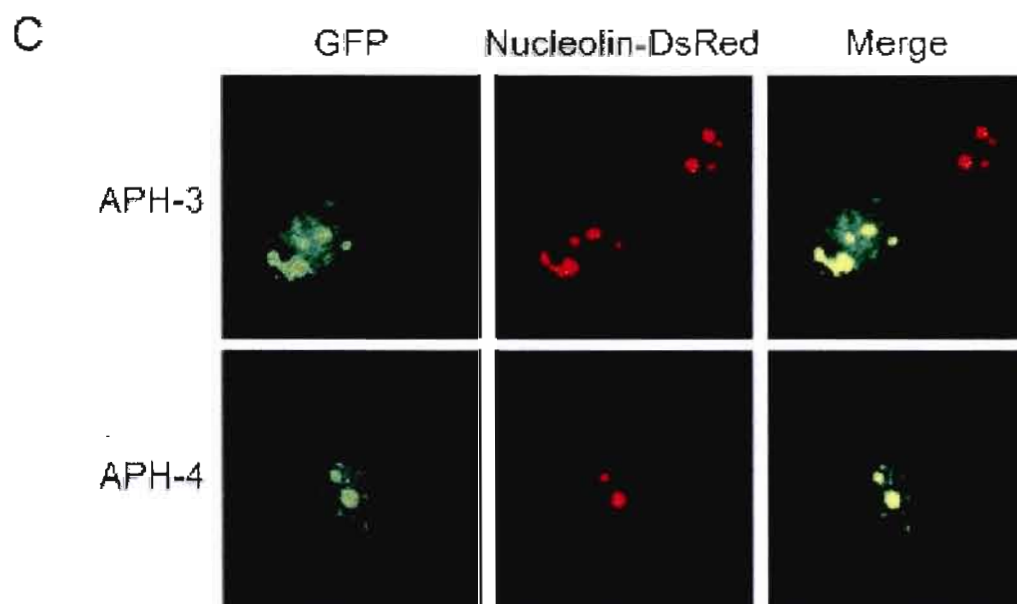


Figure 2.5

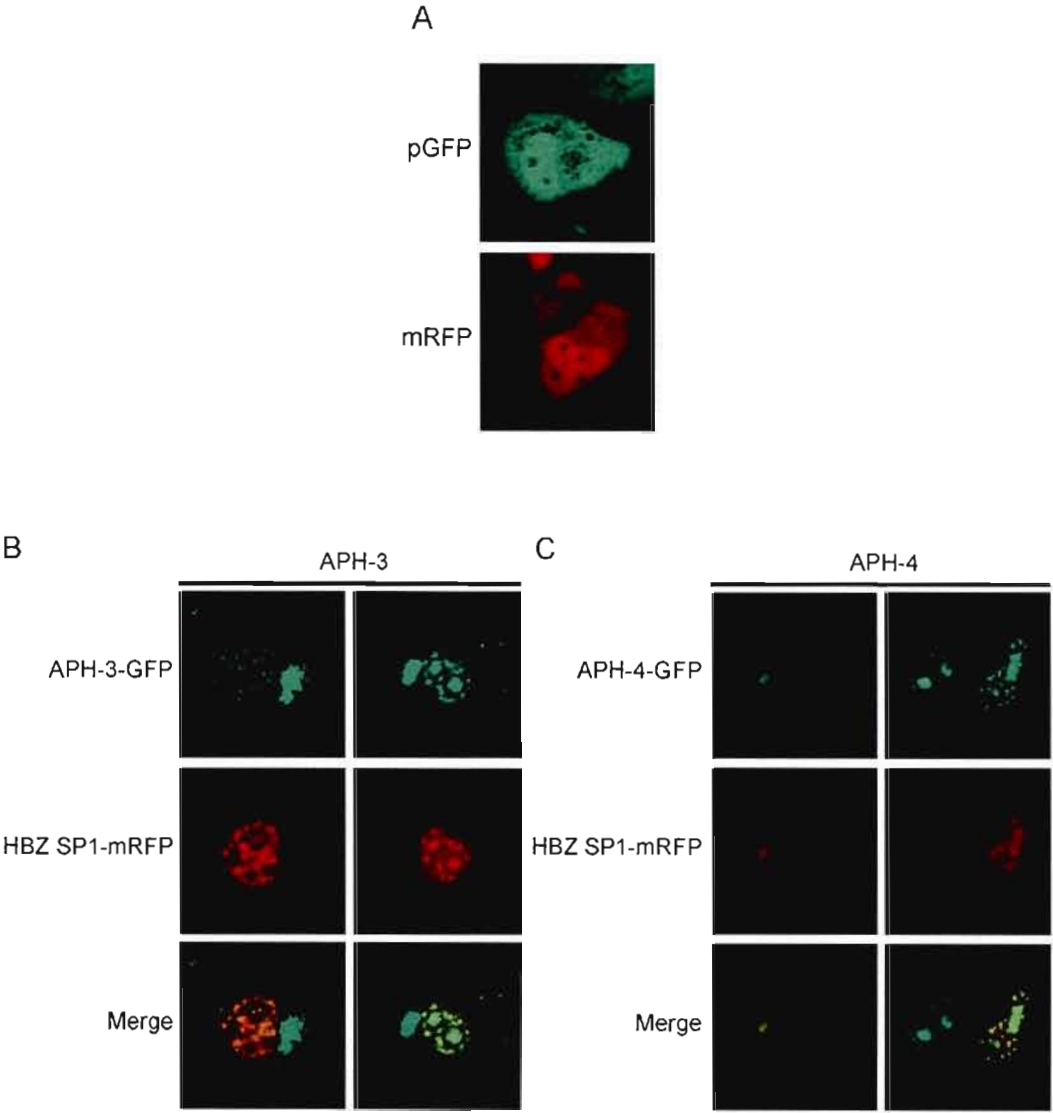


Figure 2.6

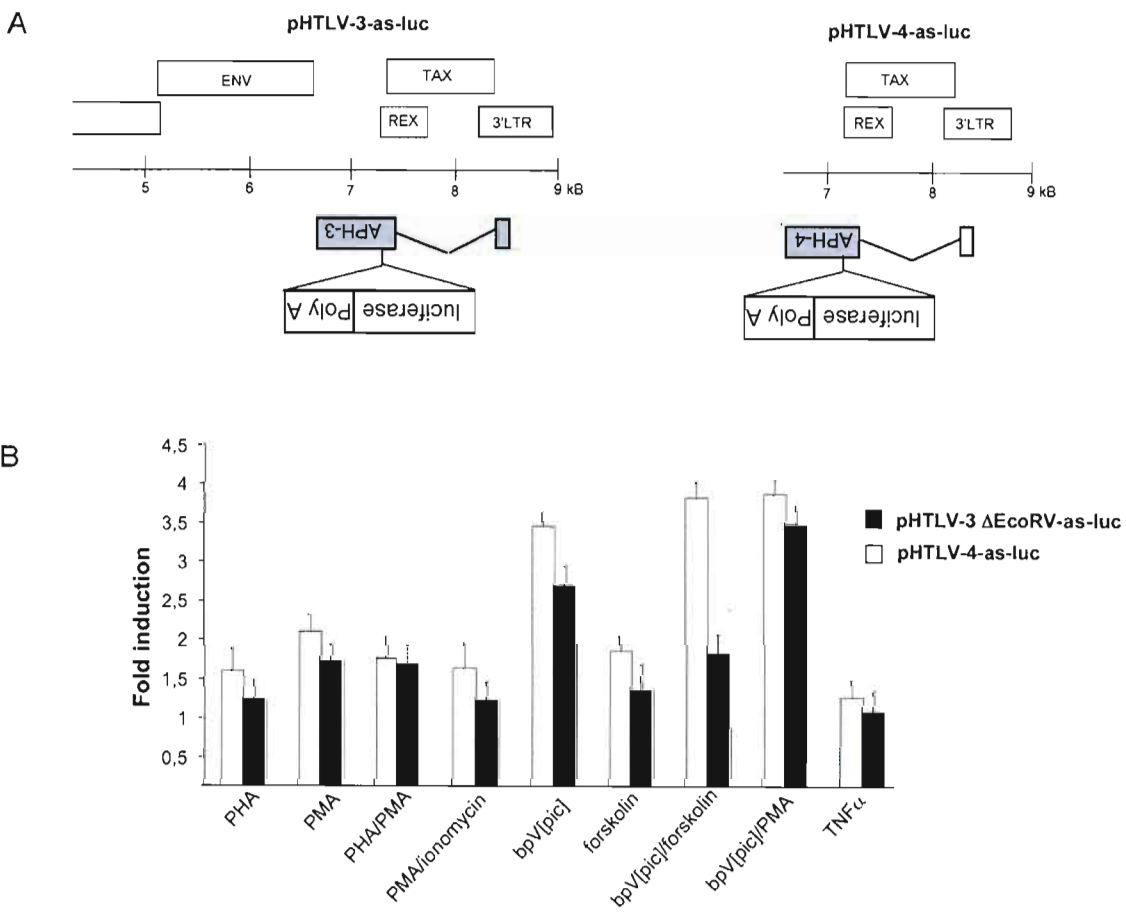


Figure 2.7

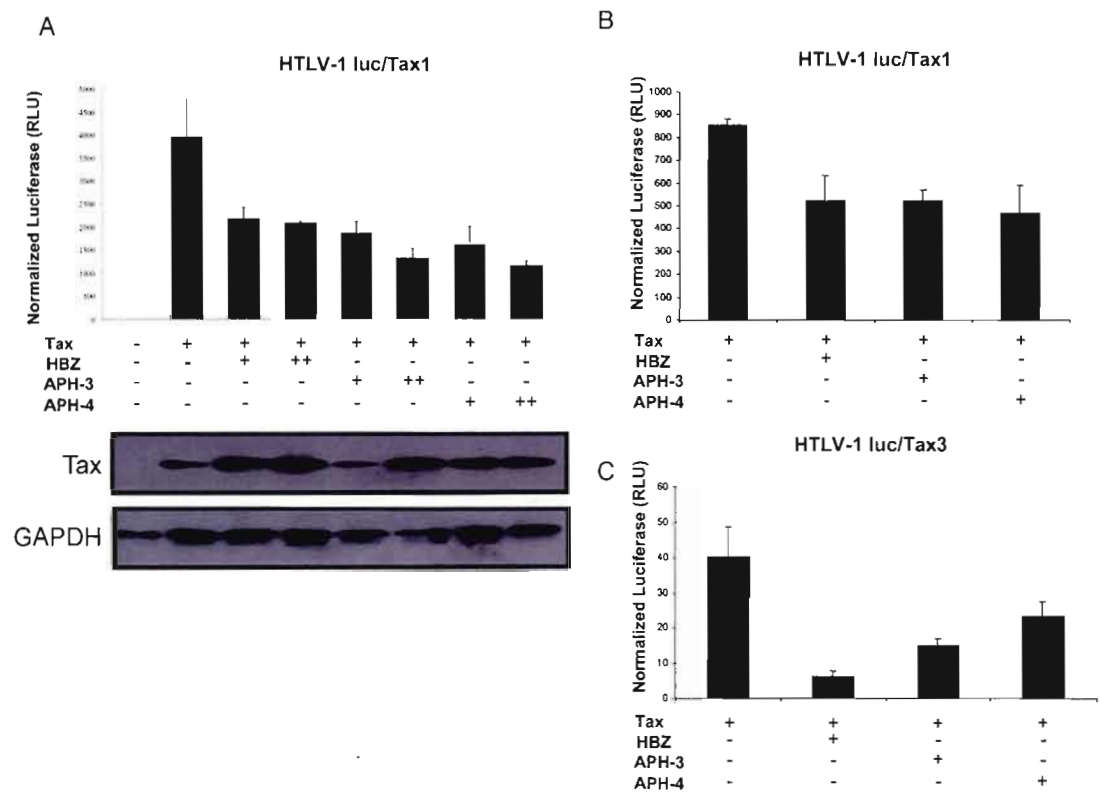


Figure 2.8

CHAPITRE III

ARTICLE 2

3.1 Contribution des auteurs

Titre de l'article :

HTLV-3 and HTLV-4 antisense proteins activate JunB-, c-Jun- and JunD-dependent transcription

Auteure principale : Émilie Larocque

Collaborateurs : Dr Jean-Michel Mesnard et Dr William Switzer

Directeur de recherche : Dr Benoit Barbeau

Ce deuxième article a été rédigé par moi-même Émilie Larocque avec le soutien du Dr Barbeau. La totalité des expériences a aussi été réalisée par moi-même.. Marilène Halin et Dr Sébastien Landry ont quand à eux participé aux idées scientifiques. Dr Switzer nous a fourni les ADN proviraux de HTLV-3 et HTLV-4. De plus, Dr Mesnard a fourni les différents vecteurs d'expression Jun et la construction collagénase. Cette étude réalisée dans le laboratoire du Dr Barbeau, a mené à cet article rédigé selon les exigences de l'Université du Québec à Montréal. La version soumise comme « short communication » au journal « Journal of Virology » a cependant été modifiée afin de répondre à leurs exigences.

3.2 HTLV-3 and HTLV-4 antisense proteins activate JunB-, c-Jun- and JunD-dependent transcription

Émilie Larocque¹, Marilène Halin¹, Sébastien Landry^{1,5}, William M. Switzer³, Jean-Michel Mesnard⁴ and Benoit Barbeau^{1,2†}

¹Département des Sciences Biologiques et ²Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, 2080 Saint-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2X 3X8, ³Laboratory Branch, Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV, STD, and TB prevention, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333, ⁴Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Centre National de la Recherche Scientifique/UM1/UM2 Unité Mixte de Recherche 5236, Montpellier, France ;⁵Current address: Laboratory of Genetics, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA

[†] Correspondance to Benoit Barbeau, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, 2080 Saint-Urbain Montréal, Québec, Canada H2X 3X8. Tel: 514 987-3000 ext.4576, Fax: 514 987-4647, E-mail: barbeau.benoit@uqam.ca

3.2.1 Abstract

HTLV-3 and HTLV-4 are two newly discovered human retroviruses. These retroviruses have not yet been linked to any diseases but share important similarities with the HTLV-1 virus. Over the years, the antisense protein of HTLV-1, termed HBZ, implicated in the development of ATLL has been studied and shown to interact with Jun family members and modulate their transactivation potential. We have recently identified antisense genes in HTLV-3 and HTLV-4, termed APH-3 and APH-4 respectively, encoding proteins lacking a typical bZIP domain while still inhibiting Tax transactivation capacity. In this study, we show unlike HBZ, that APH-3 and APH-4 up-regulate the transactivation potential of all Jun family members. Deletion mutants showed that the atypical bZIP domain of both APH-3 and APH-4 seem to be required.

3.2.2 Findings

The Human T-cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL) and HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) (Miyoshi et al., 1981; Poiesz et al., 1980; Poiesz et al., 1981; Yoshida et al., 1982). In North America, a link between the prevalence for T-cell lymphoma and HTLV-1 seropositivity has also been suggested (Poiesz et al., 2001). Although an important number of individuals are infected by HTLV-1, as few as 5% of infected individuals will eventually develop ATLL (Mortreux et al., 2003). HTLV-2 is closely related to HTLV-1 and shares most viral genes although this virus presents a more important tropism for CD8 + T cells (vs. CD4+ T cells for HTLV-1) (Feuer and Green, 2005). Clinically, HTLV-2 is distinct from HTLV-1, as it has only been seriously linked to HAM-like pathologies (and not to leukemia) (Araujo and Hall, 2004). Recently, new HTLV viruses, termed HTLV-3 and HTLV-4, have been isolated (Calattini et al., 2006; Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005). These viruses do not seem to be associated with any type of leukemia, although further studies are needed (Duong et al., 2008; Thomas et al., 2010).

The mechanism by which HTLV-I leads to ATLL is not well understood. One of the best studied associations between HTLV-I and oncogenesis is the viral Tax protein (Yoshida, 1993). Tax is central for HTLV-I replication acting on LTR-mediated transcription but is also known to transform human primary CD4+ T cells and to induce different cancers in mice (Benvenisty et al., 1992; Coscoy et al., 1998; Franchini, 1995; Grossman et al., 1995). This likely results from the capacity of Tax to activate multiple transcription factors and to induce genetic instability (Mortreux et al., 2003; Yamaoka et al., 1996). However, Tax is often not expressed in cells from ATLL patients and is thus dispensable at least for the late stage of leukemogenesis (Matsuoka and Jeang, 2007). Selective pressure mediated by strong anti-Tax immune response might justify the lack of Tax expression in ATLL cells.

Previous studies have shed light on the existence of the HBZ (HTLV-I bZIP) protein, which is encoded on the antisense strand of the HTLV-1 genome (Gaudray et al., 2002). Although suggested for other retroviruses (Briquet et al., 2001; Briquet and Vaquero, 2002;

Michael et al., 1994b; Peeters et al., 1996; Tagieva and Vaquero, 1997; Vanhee-Brossollet et al., 1995), these studies demonstrated for the first time the encoding potential of these retroviral transcripts. Two HBZ isoforms can be produced with one of them being most abundant and dependent on a spliced transcript (Cavanagh et al., 2006; Murata et al., 2006; Satou et al., 2006). Both HBZ isoforms block Tax-induced and basal HTLV-1 transcription and interact with several Jun family members, rendering some of these members inactive through possible sequestration in transcriptionally inactive nuclear bodies or degradation (Basbous et al., 2003; Hivin et al., 2007; Isono et al., 2008; Matsumoto et al., 2005; Thebault et al., 2004). Reports have demonstrated that HBZ also interacts with numerous other transcription factors, some of which are equally important for cell proliferation (Reinke et al., 2010; Zhao et al., 2008). Further analyses of this new gene have shown that, as opposed to the *Tax* gene, spliced *HBZ* transcripts is detected in most ATLL cell lines and PBLs from infected patients (Cavanagh et al., 2006; Murata et al., 2006; Satou et al., 2006). We and others have argued that HBZ could be a possible player in late stage leukemogenesis (Barbeau and Mesnard, 2007; Matsuoka and Jeang, 2007; Mesnard et al., 2006).

We have recently reported that HTLV-2 also produces an antisense protein (Halin et al., 2009). In addition, our latest finding has confirmed the existence of similar antisense genes in HTLV-3 and HTLV-4, termed APH-3 and APH-4 (Larocque *et al.*, unpublished data). Although these three new viral proteins lack a classical bZIP domain, they all share the capacity to act upon Tax-mediated HTLV LTR activation. Herein, we have investigated the potential modulation of Jun family members by APH-3 and APH-4 and demonstrate that, as opposed to HBZ, both viral proteins augment the transcriptional activation potential of JunD, c-Jun and JunB through their bZIP-like domain.

It has been demonstrated that HBZ down-regulates JunB- and c-Jun-dependent transcription while this protein up-regulates transcription dependent on JunD (Barbeau and Mesnard, 2007; Hivin et al., 2007; Matsumoto et al., 2005; Thebault et al., 2004). Since APH-3 and APH-4 both are capable of down regulating Tax-driven transactivation of the HTLV-1 LTR like HBZ, we tested if these newly characterized viral proteins could similarly affect cellular transcription factors of the Jun family. To test this, 293T cells were

transiently co-transfected with a construct expressing the luciferase reporter gene positioned downstream of the collagenase promoter (bearing an AP-1-binding site) (0,4 μ g) and either pCMVJunDFlag, pCMVJunB or pCMVc-Jun (0,2 μ g) together with 0,4 μ g of pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4 or the empty vector pcDNA3.1 and pRcActin-lacZ (0,2 μ g) using the LipofectamineTM 2000 reagent (Invitrogen) according to manufacturers' instructions. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured, normalized by β -galactosidase activity and the average of four independent transfections (\pm S.D) was calculated. In Figure 3.1 (A-C), the effect of HBZ on the modulation of the collagenase promoter by the different Jun members was confirmed, i.e. both JunB and c-Jun were negatively affected while JunD presented a more pronounced activation potential (Barbeau and Mesnard, 2007; Thebault et al., 2004). Surprisingly, both APH-3 and APH-4 activated transcription for all tested Jun family members. Since, HBZ inhibits JunB- and c-Jun-dependent transcription by re-localizing these transcription factors into inactive nuclear bodies while re-localizing JunD to the HBZ-associated speckles, we were thus interested in determining if APH-3 and APH-4 could also impact on the cellular distribution of Jun proteins. COS-7 cells were thus transfected with pCMVJunDFlag (0,4 μ g) and pMycAPH-3(0,4 μ g) or pMycAPH-4 (0,4 μ g) using the LipofectamineTM 2000 reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0,5% Triton at 36 hours post-transfections. Cells were immunostained using an anti-myc antibody (A14) purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz CA), and the monoclonal antibody ANTI-FLAG[®]M2, clone M2 (Sigma-Aldrich, St. Louis) and subsequently mounted in ProLong Antifade on slides for confocal microscopy. When expressed alone, a typical signal for JunD was observed, which was reflected by the diffuse pattern presented throughout the nucleus (Figure 3.1D) (Thebault et al., 2004). When either APH-3 or APH-4 was co-expressed with JunD, the previously described signal was observed for APH-3 and APH-4, with nuclear speckle structures in the nucleus while APH-3 was also partially observed in the cytoplasm. Unexpectedly, JunD was not re-localized to these nuclear speckles, which is different from the observed effect of HBZ on this Jun member (Figure 3.1D). Since APH-3 and APH-4 only partially co-localize with HBZ (Larocque *et al.*, unpublished data), these proteins might have developed different

mechanisms to regulate Jun-dependent transcription. We are currently analysing if APH-3 and APH-4 have the capacity to re-localize JunB or c-Jun .

We were then interested in identifying functional regions in APH-3 and in APH-4 responsible for this increase in activation potential mediated on the various Jun family members. To do so, we progressively removed regions representing the leucine zipper motif, the DNA binding domain, the BR1 and BR2 motifs (Figure 3.2A). The deletion mutants were generated from the pMycAPH-3 and pMycAPH-4 constructs (Larocque *et al.*, unpublished data) using the PhusionTM Site-Directed Mutagenesis Kit according to manufacturer's instructions. For the APH-3 deletion mutants, the forward primer 5'-GAGGAATACTTTTGGTATATGGACTGTT-3' was used in combination with either the reverse primer 5'-GTCTATACAGTCCAGTTGCTGTCG-3' for pMycAPH-3Δ157, 5'-CCTCTCCTCCAGCTCTTCGC-3' for pMycAPH-3Δ142, 5'-CCAATAACTCAGCAGTTGCTCCTG-3' for pMycAPH-3Δ122 or 5'-GGGTCGTTTGCCATTCCCCTG-3' for pMycAPH-3Δ89. For the APH-4 deletion mutants, the

forward primer 5'-GGAGAATTATTTTCGGTTATCAGCTGG-3' was used in different combinations with the reverse primer 5'-GTCCATGCACTTCCGTTGTTGATG-3' for pMycAPH-4Δ103, 5'-TTGATGACGCGCCTCTCTCTCCTTGCGCT-3' for pMycAPH-4Δ97, 5'-CAGGAGCCGCTGAATCTCCG-3' for pMycAPH-4Δ68 or 5'-TTTGCGCGCACGACGAGCG-3' for pMycAPH-4Δ36. Each mutant was verified for its stability by western blot analyses. 293T cells were thus transiently transfected with pMycAPH-3WT, pMycAPH-4WT or their respective mutants as described above. A total of 40μg of total cell extracts were loaded on a 15% SDS-PAGE gel. The membrane was incubated with an anti-Myc antibody and revealed as previously described (Larocque *et al.*, unpublished data). As depicted in Figure 3.2B, the signal for pMycAPH-3WT, pMycAPH-3Δ157 and pMycAPH-3Δ142 was more intense than for pMycAPH-3Δ122, whereas pMycAPH-3Δ89-expressing cells presented no detectable signal. The same observation was made in the case of APH-4 (Figure 3.2B right panel). The plasmids pMycAPH-4WT, pMycAPH-4Δ103, pMycAPH-4Δ97 had a high level of expression while pMycAPH-4Δ68

was poorly detected. However, pMycAPH-4 Δ 36 could not be detected by western blot analysis.

Similarly to HBZ, APH-3 and APH-4 have very basic regions adjacent to their atypical leucine zipper motif and these proteins are found in speckle structures in the nucleus when observed by confocal microscopy (Larocque *et al.*, unpublished data). To verify if the various deletion mutants of APH-3 and APH-4 altered cellular localization of these proteins, using the LipofectamineTM 2000 reagent, we transfected COS-7 cells with pMycAPH-3WT, pMycAPH-3 Δ 157, pMycAPH-3 Δ 142, pMycAPH-3 Δ 122, pMycAPH-3 Δ 89, pMycAPH-4WT, pMycAPH-4 Δ 103, pMycAPH-4 Δ 97, pMycAPH-4 Δ or pMycAPH-4 Δ 36. After 36 hours, cells were fixed and permeabilized with methanol. The cells were then immunostained with an anti-Myc antibody and the nucleus was stained using propidium iodide (P.I.), as previously described (Larocque *et al.*, unpublished data). Cells were mounted in ProLong Antifade and analysed by confocal microscopy. All four APH-3 mutants similarly localised in the nucleus in speckle structures (Figure 3.2C). However, the signal differed lightly from APH-3WT in that the signal at the nucleolus seemed to be more pronounced. In the case of APH-4, the mutants also localized in the nucleus (Figure 3.2D). In these analyses, based on similar studies on HBZ, we would have expected that the pMycAPH-3 Δ 89 and pMycAPH-4 Δ 36 expression vectors would have presented a non nuclear signal given that the resulting proteins were devoid of any BR regions corresponding to those of HBZ (Hivin *et al.*, 2005). Further deletion mutants should help identify all NLS required for proper nuclear localizations of APH-3 and APH-4.

As mentioned above, APH-3 and APH-4 possess bZIP-like domains showing irregularly spaced leucines or isoleucines and thereby not qualifying as a typical leucine zipper motif following *in silico* analysis. Given that the analyzed mutants (see above) showed similar localization, the deletion mutants were transfected in 293T cells using the above approach (Figure 3.1) to identify APH-3 and APH-4 regions responsible for the increment in the transactivational potential of Jun family members. The mutants in which the leucine zipper motif was minimally removed (mutants pMycAPH-3 Δ 157 and pMycAPH-4 Δ 103) demonstrated complete loss of their transactivational potential on c-Jun- and JunD-dependent positive modulation of the collagenase promoter construct, implying that this

region alone is important for the up-regulation the transcriptional activation by Jun members (Figure 3.3).

An example of an atypical bZIP domain capable of forming a coiled-coil structure with a protein-protein interaction capacity has been previously demonstrated for the EBV transcription factor Zta (Schelcher et al., 2007). In this study, we have demonstrated that both APH-3 and APH-4 can potentiate the transcriptional activation properties of all tested Jun family members and that this effect depends on the presence of the bZIP-like domain. It is thereby likely that these viral proteins interact with Jun members through this domain and current experiments are addressing this issue.

3.2.3 Acknowledgments

This work was supported by a grant to B.B. from The Cancer Research Society (CRS) Inc. B.B. holds a Canada Research Chair in human retrovirology (Tier 2). We would also like to thank Denis Flipo for his excellent technical support for experiments related to confocal microscopy.

3.2.4 Figure Legends

Figure 3.1. APH-3 and APH-4 activate Jun-dependent transcription of the collagenase promoter without their relocation.

pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4 or the empty vector pcDNA3.1 were co-transfected in 293T cells along with the collagenase promoter fused with the luciferase gene and with the expression vector for (A) JunB, (B) c-Jun or (C) JunD along with pRcActin-lacZ. Forty eight hours post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Results were normalized for β -galactosidase activity (\pm S.D). These results are a representation of 3 independent experiments. (D) COS-7 cells were transfected with expression vectors for JunD, APH-3 or APH-4. Thirty-six hours post-transfection, cells were fixed with 4% PFA and permeabilized with 0,5% Triton. Cells were then immunostained using an anti-Myc (green) and anti-Flag (red) antibodies and observed by confocal microscopy.

Figure 3.2. Cellular localisation of the deletion mutants of APH-3 and APH-4.

(A) Schematic representation of the expression vector for the WT APH-3 or APH-4 and their respective deletions mutants. The positioning of the domain is based on comparison to the previously identified functional regions of HBZ, which is shown above. (B) Cell lysates were prepared 48 hours post-transfection from 293T cells transfected with expression vectors for APH-3, APH-3 Δ 157, APH-3 Δ 142, APH-3 Δ 122, APH-3 Δ 89, APH-4, APH-4 Δ 103, APH-4 Δ 97, APH-4 Δ 68 or APH-4 Δ 36. Signals were then detected by western blot analysis using an anti-Myc antibody. The film was exposed for a different length of time to detect certain mutants (top and bottom). (C, D). Cos-7 cells were transfected with either expression vectors for WT APH-3 or its mutants APH-3 Δ 157, APH-3 Δ 142, APH-3 Δ 122, APH-3 Δ 89 and WT APH-4 or its mutants APH-4 Δ 103, APH-4 Δ 97, APH-4 Δ 68, APH-4 Δ 36. Cells were fixed with methanol for 20 minutes at 36 hours post-transfection. APH-3 and APH-4 were revealed with an anti-Myc antibody (green) (left panel) in the presence of P.I. for nuclear staining (red) (middle panel). The right panel represents a merge of the anti-Myc and P.I. signals. Cells were observed by confocal microscopy.

Figure 3.3. Deletion of the APH-3 and APH-4 bZIP-like domain abolishes their impact on the transcriptional activation potential of c-Jun and JunD.

293T cells were co-transfected with either APH-3, APH-3 Δ 157, APH-3 Δ 142, APH-3 Δ 122 or APH-3 Δ 89 expression vector or APH-4, APH-4 Δ 103, APH-4 Δ 97, APH-4 Δ 68 or APH-4 Δ 36 expression vectors together with the collagenase promoter fused to the luciferase gene and with either the expression vector for c-Jun (A) or JunD (B) along with pRcActin-lacZ for normalization. Cells were lysed and luciferase activity was measured at forty eight hours post-transfection. Results were normalized by β -galactosidase (+/- S.D) and are a representation of 3 independent experiments.

3.2.5 Figures

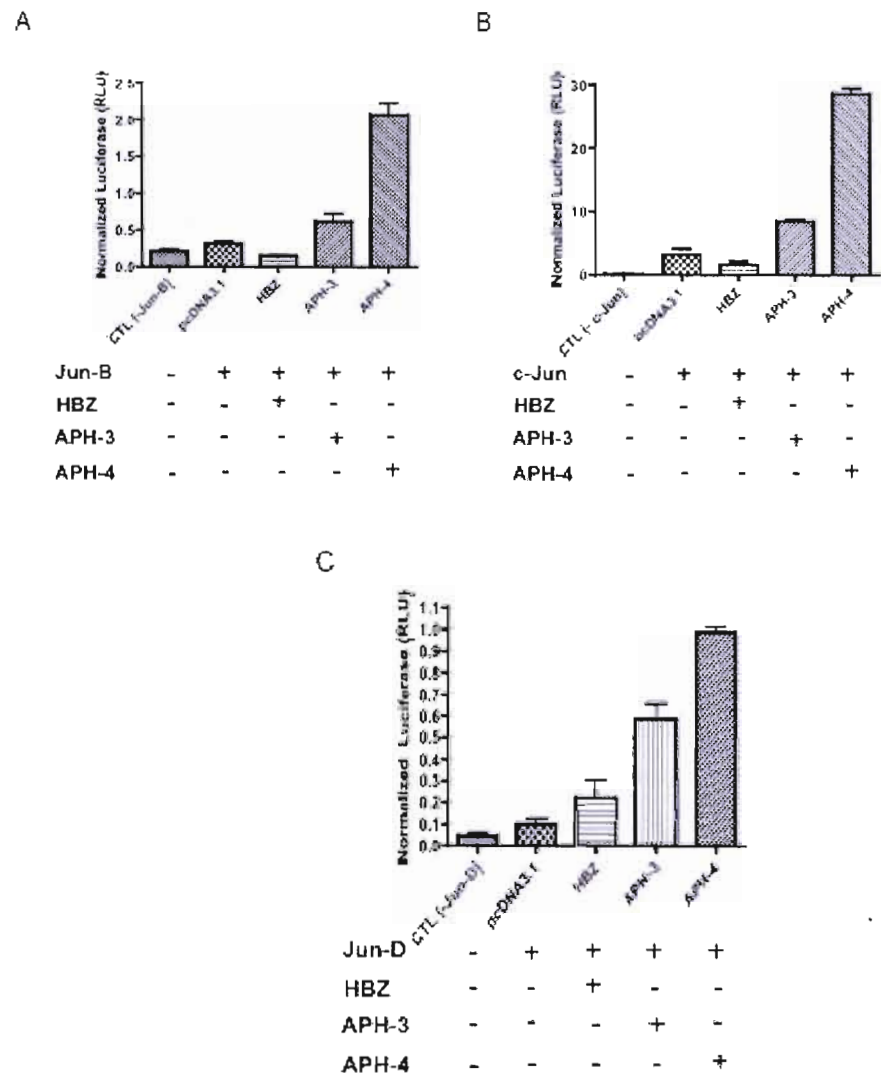


Figure 3.1

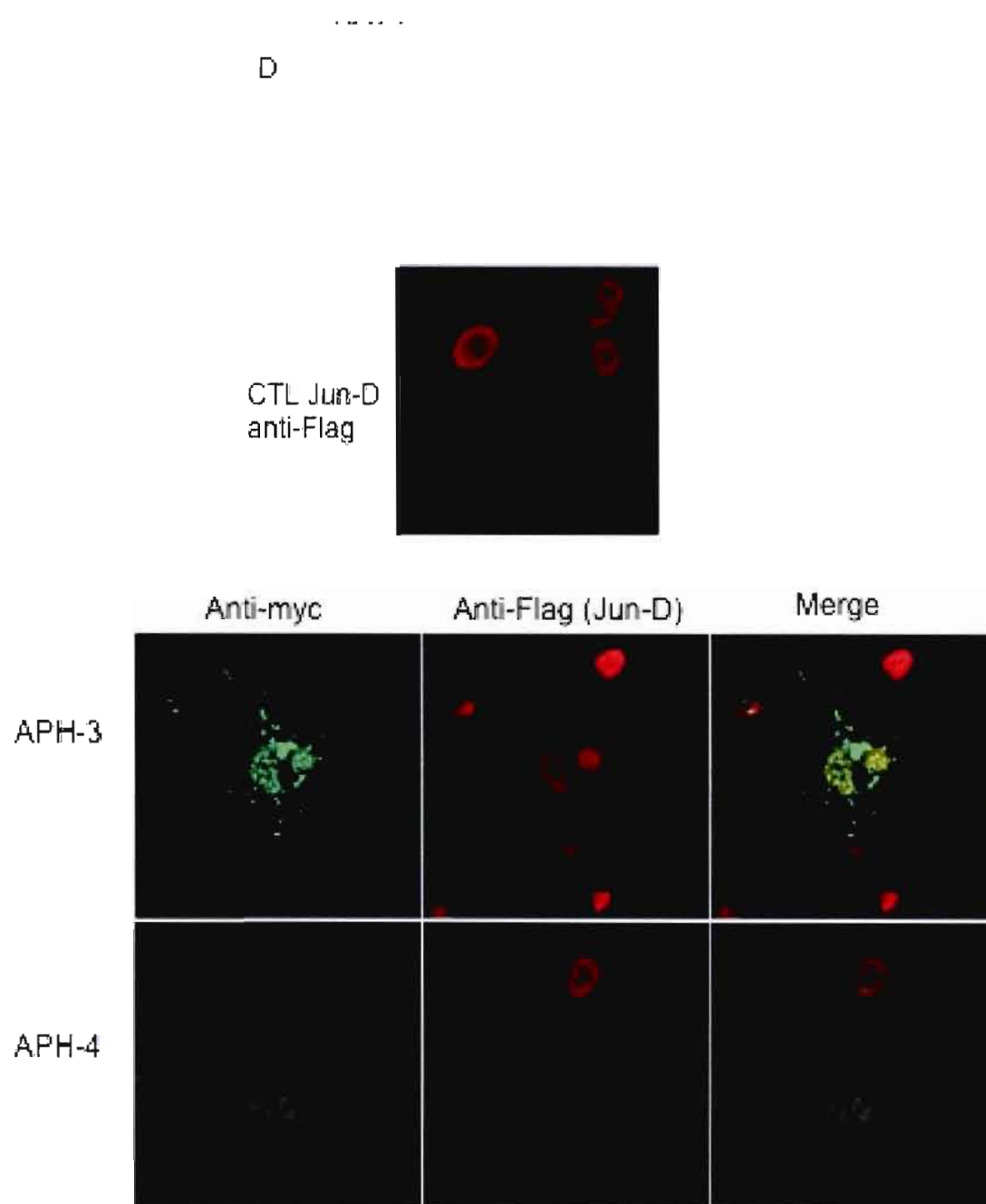
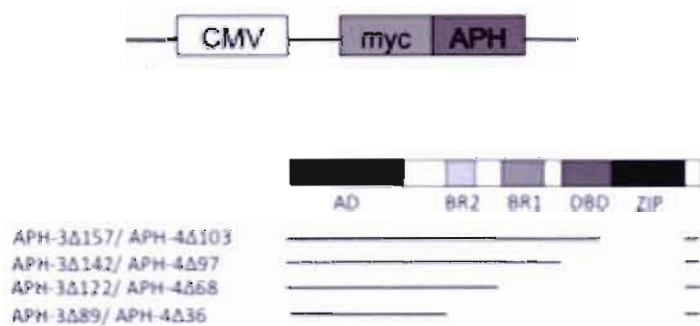


Figure 3.1

A



B

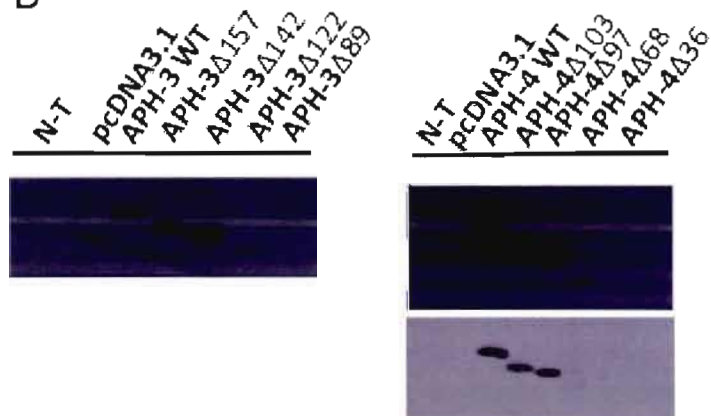


Figure 3.2

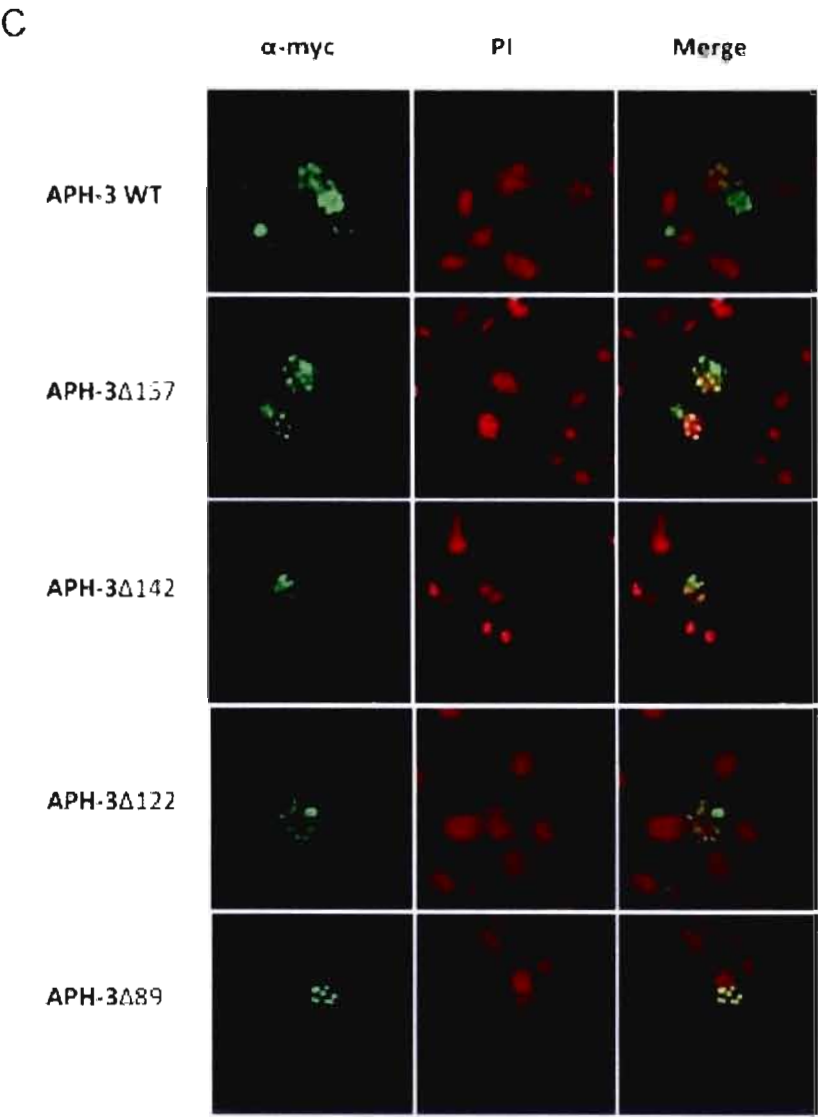


Figure 3.2

D

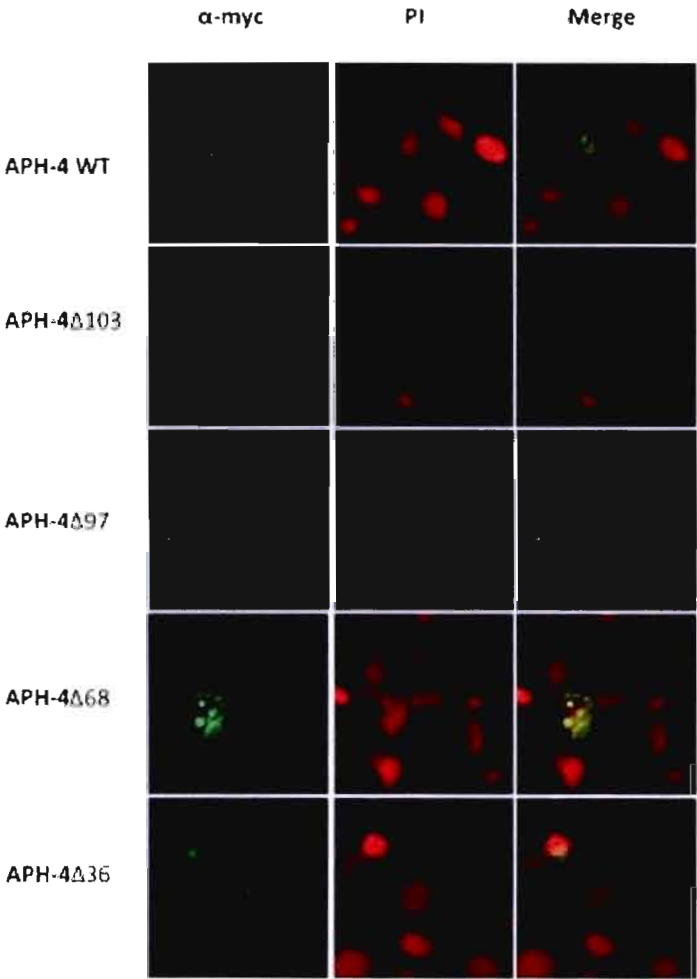
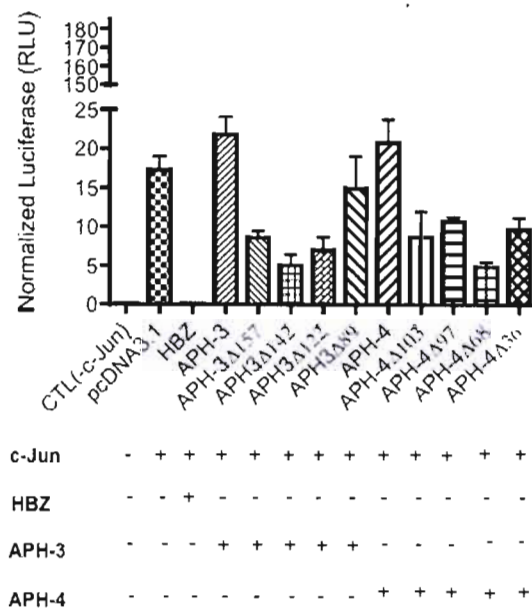


Figure3.2

A



B

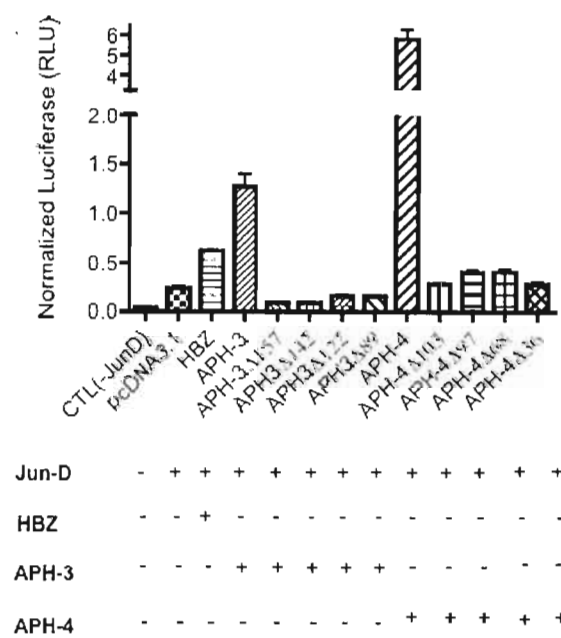


Figure 3.3

CHAPITRE IV

DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE AUX ARTICLES ET CONCLUSIONS

Selon nos analyses *in silico*, des ORF ont été identifiés entre les gènes *env* et *tax/rex* sur le brin complémentaire de HTLV-3 et HTLV-4. Ces ORF auraient le potentiel de coder pour des protéines de 221 et 158 acides aminés respectivement. Lors de cette étude, nous avons détecté par RT-PCR des transcrits antisens que nous avons nommé *APH* (*Antisense protein of HTLV*)-3 et -4. Les résultats de 5'RACE et 3'RACE ont démontré que les transcrits *APH*-3 et *APH*-4 ont plusieurs sites d'initiation dans le LTR 3' en plus d'être épissés et polyadénylés. La traduction de ces transcrits antisens naturels entraîne la production de nouvelles protéines rétrovirales jouant des rôles spécifiques au niveau de la transcription. La localisation cellulaire de ces protéines est principalement apparue nucléaire ainsi que partiellement cytoplasmique pour APH-3 dans différentes lignées cellulaires. Des études de co-localisation ont permis d'identifier que les granules retrouvés au niveau du noyau co-localisent partiellement avec les granules de la protéine virale de HTLV-1, HBZ. De plus, grâce à une étude de co-localisation avec la nucléoline, nous avons aussi mis en avant une localisation nucléolaire de ces protéines. D'autre part, cette étude a démontré que ces nouvelles protéines inhibent la transcription dépendante de la protéine trans-activatrice Tax et activent la transcription dépendante des facteurs de transcription de la famille Jun. Aussi, l'activation de la transcription par ces protéines Jun semble être modulée par la région présentant un motif « leucine zipper » atypique. Cependant, cette même région ne semble pas être impliquée dans l'inhibition de la transcription Tax-dépendante (voir annexe). Ces

travaux de maîtrise soulignent clairement la présence de transcrits antisens naturels ayant la capacité d'être traduits chez les rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4. Ainsi, les protéines codées ont des fonctions spécifiques au niveau de la réplication rétrovirale. Enfin, nous démontrons que la famille des rétrovirus a évolué afin de conserver ces ORF permettant de coder pour ces protéines conférant ainsi au virus une régulation rigoureuse.

4.1 Étude de la localisation cellulaire de APH-3 et APH-4

4.1.1 **Les protéines APH-3 et APH-4 possèdent une localisation majoritairement nucléaire**

Des constructions plasmidiques contenant l'ADN complémentaire de APH-3 et APH-4 contenant une étiquette myc en N-terminal avaient préalablement fait l'objet d'étude de localisation. Les résultats préliminaires avaient démontré que les 2 protéines se retrouvaient au niveau du noyau et également au niveau du cytoplasme pour APH-3. Suite à cette observation, nous avons construit des plasmides où l'ADNc de APH-3 et APH-4 fut placé dans le même cadre de lecture que la « *enhanced green fluorescent protein* » (eGFP) en C-terminal où l'ATG de la protéine eGFP a été muté pour un TTG. Cette mutation a entraîné le changement d'une méthionine pour une leucine permettant de limiter la production de eGFP libre. Ces constructions nous ont ensuite permis de faire des études de localisation en temps réel. Ainsi, les résultats ont confirmé que APH-3 était principalement nucléaire et partiellement cytoplasmique alors que APH-4 était strictement nucléaire. De plus, ces constructions nous ont permis de conclure que le signal observé est caractérisé par des granules et non par un signal diffus à travers le noyau. Ces résultats suggèrent que ces protéines se localisent donc de façon spécifique, potentiellement en lien associé à leurs fonctions. L'avantage de ces dernières constructions est qu'elles nous ont permis de vérifier la localisation cellulaire sans modifier les cellules, c'est-à-dire sans traitement pouvant potentiellement altérer la localisation de ces protéines. Un point important à mentionner est qu'un signal de forte intensité adjacent d'un côté du noyau a pu être observé pour APH-3 et APH-4 tout comme avec les constructions possédant l'étiquette myc (mentionné dans le

mémoire de Marilène Halin publié en 2008). Cet agrégat pourrait être la cause d'une surexpression des protéines puisque le promoteur CMV était présent dans les plasmides ou encore dû à une modification post-traductionnelle telle que l'ubiquitination. Dans ces deux cas, cet agrégat représenterait potentiellement un aggrésome permettant de dégrader et d'éliminer les protéines surexprimées. Afin de s'assurer que c'est bien le cas et non pas un signal associé à l'appareil de Golgi, des études de co-localisation, utilisant des marqueurs spécifiques à ces compartiments, pourraient être réalisées.

De plus, il existe très peu d'études faisant état de l'expression de transcrits antisens. La détection des protéines APH-3 et APH-4 dans un contexte d'infection renforcerait l'existence de ces nouvelles protéines virales. Pour ce faire, une construction contenant l'ADN proviral où une étiquette tétracycline pourrait être cloné en C-terminal de la partie codante de l'exon 2 de APH-3 et APH-4. Lorsque les protéines APH-3 et APH-4 seront traduites par la machinerie cellulaire, les protéines de fusion seront exprimées et celles-ci pourront être détectées par microscopie confocale en présence du substrat de la tétracycline. Ainsi, leur détection dans ce contexte proviral confirmerait que ces transcrit antisens sont en effet traduits et démontreraient l'existence de nouvelles protéines virales faisant partie de la famille des rétrovirus et le tout en temps réel.

4.1.2 Les protéines APH-3 et APH-4 co-localisent partiellement au noyau avec HBZ

Lorsque nous avons confirmé la localisation des protéines APH-3 et APH-4, nous avons émis l'hypothèse que ces protéines pourraient possiblement se retrouver dans le même compartiment nucléaire que la protéine antisens HBZ. Pour se faire, nous avons cloné la séquence codante pour HBZ dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 où la séquence de mRFP était insérée et où HBZ était cloné en aval de mRFP. Les cellules COS-7 ont ensuite été co-transfectées en combinaison avec les constructions. Les observations au microscope confocal nous ont permis de démontrer que les protéines APH-3 et APH-4 co-localisaient effectivement avec HBZ au niveau du noyau. Cependant, il est apparu que plusieurs granules

ne co-localisaient pas ensemble. Aussi, nous avons fait l'observation que certains signaux ne co-localisaient aucunement. Une observation similaire a été faite avec HBZ; chez les cellules transfectées, HBZ avait différents types de patrons de localisation (Hivin et al., 2005). Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que ces différentes localisations pourraient être le résultat des divers rôles que HBZ pourrait accomplir au niveau de la régulation (Hivin et al., 2005). Quant à APH-3 et APH-4, il se pourrait donc que la variabilité du signal observé puisse également être attribuée aux diverses fonctions de APH-3 et APH-4. De plus, ces protéines antisens pourraient également jouer des rôles différents de ceux joués par HBZ, expliquant ainsi une localisation nucléaire différente entre APH-3, APH-4 et HBZ.

À l'aide du programme bioinformatique « Subnuclear Compartments Prediction System » (Version 2.0), les protéines APH-3 et APH-4 devraient être localisées au « nuclear lamina ». Ce compartiment est un réseau de protéines filamenteuses associées à l'enveloppe nucléaire interne. De façon intéressante, ce compartiment régule l'expression génique en séquestrant les facteurs de transcription (Kind and van Steensel). Certaines protéines liant l'ADN ou protéines de la chromatine peuvent lier des loci à la lamina nucléaire (Kind and van Steensel). Afin d'identifier le compartiment auquel les protéines APH-3 et APH-4 sont associées et qui ne co-localisent pas avec HBZ, des études de co-localisation par microscopie confocale avec les compartiments sous-nucléaire pourraient être réalisées. Certains compartiments peuvent être préalablement éliminés tels que les corps Cajal, ces derniers ayant une forme sphérique et une taille relativement petite (0.1–1.0 μm) (Dundr and Misteli, 2001). Seulement 1 à 5 copies sont présentes par noyau (Dundr and Misteli, 2001). Par contre, puisqu'une quantité plus importante de corps est présente dans les cellules exprimant APH-3 et APH-4, la possibilité que APH-3 et APH-4 se retrouvent dans ce compartiment peut être écartée. Un compartiment possible est le PML (*Promyelocytic Leukaemia*) puisqu'il est associé à des sites de transcription et de réplication virales dans les étapes précoces d'une infection (Dundr and Misteli, 2001). Ils ont une taille d'environ 0.2–1.0 μm et leur nombre varie dépendamment du cycle cellulaire (Dundr and Misteli, 2001). Aussi, il est suggéré que les corps PML pourraient agir comme site de stockage pour les protéines afin de créer un équilibre intra-nucléaire. Ce compartiment pourrait faire partie des autres structures auxquelles les protéines APH-3 et APH-4 sont associées. Ces protéines sont non seulement impliquées dans la régulation de la transcription et réplication rétrovirale, mais leur

expression doit être rigoureusement régulée puisque qu'elles inhibent la trans-activation par Tax. Cependant, des expériences de co-localisation en microscopie confocale ont démontré que HBZ ne co-localisait pas avec les PML (Hivin et al., 2005). De façon intéressante, la protéine CBP (*Creb Binding Protein*) est retrouvée dans les corps PML, une protéine qui interagit possiblement avec APH-3 et APH-4 afin de réguler l'inhibition de la trans-activation par Tax si l'on se base sur le mécanisme d'action de HBZ (Boisvert et al., 2001).

4.1.3 Les protéines APH-3 et APH-4 sont aussi nucléolaires

Il a été démontré que HBZ était non seulement nucléaire mais également nucléolaire alors que APH-2 est strictement nucléaire (Halin et al., 2009). Puisque nous avons démontré que APH-3 et APH-4 co-localisent de façon partielle avec HBZ, nous avons vérifié si elles pouvaient également se retrouver au niveau des nucléoles. Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec une construction dsRed-nucléoline, une protéine spécifique au nucléole et avec les vecteurs d'expression de APH-3 ou APH-4. Les analyses par microscopie confocale nous ont permis de conclure que APH-3 et APH-4 sont localisées aux nucléoles. Cependant, tout comme avec la co-localisation avec HBZ, certaines cellules ne démontraient pas de co-localisation, tandis que pour d'autres cellules, la co-localisation se faisait autour du nucléole. Une explication pour la variabilité du signal dans certaines cellules pourrait se trouver dans le fait que ces protéines accomplissent elles aussi diverses fonctions. Enfin pour la deuxième observation où le signal apparaît autour du nucléole dans certaines cellules, il est possible que APH-3 et APH-4 soient associées à un compartiment sous-nucléolaire. Les nucléoles se séparent en trois compartiments soit le « Fibrillar component » (FC), le « granular component » (GC) et le « dense fibrillar center » (DFC) (Emmott and Hiscox, 2009). Des études de co-localisation utilisant des marqueurs spécifiques de ces compartiments pourraient s'avérer pertinentes. La nucléoline est un premier indice puisque cette protéine est associée au GC et au DFC (Dundr et al., 2000; Emmott et al., 2008). De plus, le cycle cellulaire peut avoir un impact sur la localisation de ces protéines; dépendamment de l'étape du cycle, les protéines peuvent se retrouver à des endroits différents. De façon intéressante, il a été démontré que HBZ avait une localisation nucléolaire plus spécifiquement associée à

l'hétérochromatine qui est distribuée autour des nucléoles (Hivin et al., 2005). Aussi, il a été mis de l'avant que les nucléoles ont un fort lien avec le compartiment d'hétérochromatine. Ce compartiment ne possède pas de membrane mais contient de l'hétérochromatine condensée (Emmott and Hiscox, 2009). Plusieurs protéines nucléolaires semblent être associées à l'hétérochromatine telles que Polycomb et pKi-67 (Scholzen et al., 2002). Tout comme APH-3 et APH-4, une minorité de cellules où HBZ n'était pas associée à l'hétérochromatine a déjà été observée (Hivin et al., 2005). Ces structures restent toujours à être déterminées. Les structures autour des nucléoles auxquelles APH-3 et APH-4 sont associées pourraient potentiellement être également l'hétérochromatine, la structure périnucléolaire retrouvée en périphérie des nucléoles ou encore un des compartiments mentionnés précédemment.

Il serait également intéressant de non seulement savoir où dans le nucléole APH-3 et APH-4 sont retrouvés, mais aussi de comprendre comment APH-3 et APH-4 procèdent pour se rendre à ce compartiment. Plusieurs NOS (*nucleolar targeting signal*) permettant aux protéines de se rendre aux nucléoles ont été identifiés au fil des années. Les protéines Rev et Tat chez VIH et Rex chez HTLV-1 contiennent un NOS consensus et associé à leur NLS (Cochrane et al., 1990; Dang and Lee, 1989; Hatanaka, 1990; Kubota et al., 1989). Cependant, il a été démontré tout récemment que la protéine Rex chez BIV contient un NOS non consensus; ce NOS est indépendant de son NLS bipartite atypique (Gomez Corredor and Archambault, 2009). Celui-ci se situe entre les deux régions basiques représentant le NLS. Ainsi, il serait pertinent d'identifier si le signal de localisation nucléolaire (NOS) de APH-3 et APH-4 est consensus ou s'il fait exception à la règle tout comme Rex chez BIV.

Un point à retenir est que APH-3 et APH-4 pourraient se rendre à ce compartiment sous-nucléaire, ce qui ne serait pas dû à un NOS mais à des interactions avec les acides nucléiques. De plus, APH-3 et APH-4 contiennent un domaine de liaison à l'ADN (DBD). Cependant, la fonctionnalité de ce motif n'a pas encore été évaluée. Toutefois, le DBD chez HBZ ne lie pas l'ADN (Gaudray et al., 2002). Nous supposons donc que cela en est de même pour APH-3 et APH-4, écartant la possibilité que ces protéines puissent se rendre aux nucléoles en se liant aux acides nucléiques. Enfin, APH-3 et APH-4 pourraient également se rendre aux nucléoles en interagissant avec d'autres protéines contenant un NOS.

4.1.4 APH-3 et APH-4 requièrent des NLS différents de HBZ

Des mutants de délétion ont été générés afin d'identifier le signal de localisation nucléaire. En alignant les séquences protéiques de APH-3 et APH-4 avec HBZ, nous avons identifié les régions représentant le motif « leucine zipper » atypique, le domaine de liaison à l'ADN ainsi que leurs deux régions basiques. Il a été démontré que HBZ possède 3 NLS localisés dans les régions BR2, BR1 ainsi que dans le domaine de liaison à l'ADN (Hivin et al., 2005). Cependant, seulement 2 NLS sont nécessaires afin de donner la caractéristique nucléaire à HBZ (Hivin et al., 2005). Il existe plusieurs types de NLS. Tout d'abord, il y a les NLS qui ressemblent à celui retrouvé chez l'antigène grand T de SV40. Ce NLS est représenté par une courte région d'acides aminés basiques (T-ag - PKKKRKV¹³²) (Jans et al., 2000). Il y a également les NLS bipartites de type court ou de type long qui consistent en 2 régions d'acides aminés basiques séparés par environ 8-16 ou 30-32 acides aminés respectivement (Jans et al., 2000). De plus, il existe un autre type de NLS où les acides aminés polaires et chargés sont entrecoupés par des résidus non polaires comme par exemple Mat α 2 chez la levure (Jans et al., 2000). Enfin, il existe les NLS où une région basique est flanquée entre des prolines et les acides aspartiques (Jans et al., 2000). Cependant, tous les NLS requièrent la reconnaissance de l'hétérodimère des importines α et β 1 (Jans et al., 2000). Un point important à mentionner est qu'aucun NLS consensus n'a pu être prédit pour APH-3 et APH-4 par des analyses *in silico*. Cependant, une région où plusieurs acides aminés basiques tels que des arginines, des histidines et des lysines a été identifiée pour chacune des protéines (122 à 149 pour APH-3 et 50 à 99 pour APH-4).

Afin d'évaluer si APH-3 et APH-4 requièrent les mêmes NLS que HBZ ou si la région basique identifiée par les analyses *in silico* représente le NLS, les constructions plasmidiques sauvages de APH-3 et APH-4 et leurs quatre mutants ont donc été transfectés dans les cellules COS-7. Leur localisation a été analysée par microscopie confocale et a démontré des résultats inattendus. Selon les observations, tous les mutants ont pu se rendre au noyau incluant les mutants où il n'y avait ni les deux régions basiques ni le bZIP atypique. Ceci suggère que le ou les NLS de APH-3 et APH-4 diffèrent des trois NLS identifiés chez HBZ. Afin d'identifier les NLS essentiels pour la localisation nucléaire de APH-3 et APH-4, il serait pertinent de générer d'autres mutants de délétions. Un mutant de délétion intéressant à

analyser serait un où le domaine d'activation (toujours en comparant avec la séquence protéique de HBZ) situé à l'extrémité N-terminale est enlevé. Un autre mutant pourrait consister en une délétion de la partie C-terminale. De plus, il serait intéressant de faire différentes combinaisons de délétion de domaines.

Lorsque leur(s) NLS sera(ont) identifié(s), celui-ci ou ceux-ci pourra (pourront) être caractérisés, c'est-à-dire que les importines utilisées pour le transport de ces protéines au noyau pourraient être identifiées puisque plusieurs isoformes existent chez l'humain. Ceci pourrait être accompli par la méthode de co-immunoprécipitation ou encore par la méthode dite « pull-down ». Cependant, si aucun NLS n'est identifié, il serait important d'évaluer si APH-3 et APH-4 se rendent au noyau non dû à un NLS mais en se liant à une autre protéine nucléaire. Cependant, ceci est peu probable, puisque APH-3 et APH-4 semblent agir comme des facteurs de transcription virale tout comme HBZ (Basbous et al., 2003).

4.1.5 Évaluation d'un NES chez APH-3

La protéine APH-3 semble être unique comparativement aux autres protéines antisens d'HTLV. En effet cette protéine est la seule à se retrouver non seulement au noyau mais également au cytoplasme. Les analyses *in silico* utilisant le site NetNES 1.1 server, « Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals » (la Cour et al., 2004) n'ont pas identifié un motif NES (*Nuclear Export Signal*) consensus riche en résidus hydrophobes et qui serait responsable de l'exportation de la protéine vers le cytoplasme. Cependant, plusieurs NES ne sont pas consensus, ce qui pourrait expliquer que le logiciel n'ait pu reconnaître un tel motif. Dans les protéines contenant un signal d'exportation nucléaire, l'exportation se fait par un mécanisme nécessitant la formation du complexe NES-exportine CRM1 (*Chromosome Maintenance Region 1*) (Fornerod et al., 1997). La leptomycine B, un inhibiteur de l'exportine CRM1, engendre un blocage de la formation de ce complexe et conséquemment l'exportation nucléaire. Afin d'identifier la présence d'un NES dans la séquence d'APH-3, un traitement à la leptomycine B pourrait être réalisé dans les cellules

exprimant la protéine APH-3. S'il n'y a plus de signal dans le cytoplasme des cellules ayant subi le traitement, un NES serait donc présent dans la séquence de APH-3. Ceci nous permettrait d'évaluer plus précisément la localisation de APH-3, c'est-à-dire de déterminer si cette protéine se situe en effet au cytoplasme ou si cette observation est une conséquence de la surexpression de la protéine.

Finalement, les études de localisation ainsi que de co-localisation peuvent nous éclairer sur le possible rôle de ces nouvelles protéines virales puisqu'aujourd'hui les fonctions des différents compartiments sont grandement étudiées (Dundr and Misteli, 2001). Ainsi, il est important d'évaluer la localisation de APH-3 et APH-4 afin de nous guider dans l'étude fonctionnelle de ces protéines.

4.2 Étude fonctionnelle des protéines APH-3 et APH-4

4.2.1 **APH-3 et APH-4 activent la transcription dépendante de la famille Jun**

La transcription dépendante des facteurs de transcription de la famille Jun, tels que JunB, c-Jun et JunD, est modulée par HBZ. Cette protéine forme des hétérodimères avec cette famille *via* leur motif « leucine zipper ». Afin d'analyser si les protéines APH-3 et APH-4 sont également impliquées dans cette régulation, nous avons transfecté les cellules 293T avec une construction contenant le promoteur de collagénase (contenant un site AP-1 reconnu par les facteurs de transcription de la famille Jun) cloné en amont du gène de luciférase, une des protéines Jun (soit JunB, c-Jun ou JunD), et APH-3 ou APH-4 (et HBZ comme contrôle de l'expérience). Ces facteurs de transcription se lient au site AP-1 sur le promoteur et stimulent la transcription, tel que mesurée par la production de luciférase. Lorsque les protéines APH-3 et APH-4 sont exprimées, l'activation de la transcription est considérablement augmentée. Nous avons également pu confirmer que ceci a lieu en l'absence de relocalisation de ces facteurs de transcription, contrairement à HBZ qui diminue la capacité trans-activatrice dans le cas de JunB et c-Jun en relocalisant ceux-ci dans des

corps nucléaire inactifs (Clerc et al., 2009; Hivin et al., 2007). Cependant, HBZ modifie la localisation de JunD dans les granules associés à HBZ et peut par la suite activer la transcription dépendante de JunD. Selon nos observations, APH-3 et APH-4 ne modifient pas la localisation de JunD. Ces protéines ont possiblement évolué un mécanisme différent de celui d'HBZ afin de moduler la transcription. Il serait intéressant de regarder si les protéines APH-3 et APH-4 interagissent *in vitro* et *in vivo* avec les facteurs de transcription de la famille Jun. Pour ce faire, la technique du « pull-down » et des études de co-immunoprécipitation respectivement pourraient être réalisées. Aussi, afin de vérifier si APH-3 et APH-4 augmentent l'activation de la transcription dépendante de Jun à l'aide d'un domaine d'activation, les ADNc de APH-3 et APH-4 pourraient être clonés dans un vecteur contenant le domaine de liaison à l'ADN GAL4 de la levure (vecteur pBind). Ces constructions pourraient être co-transfectées avec un vecteur pG5luc (gène reporteur luciférase) contenant 5 sites de liaisons pour GAL4 en amont d'une boîte TATA. Cette expérience nous permettrait de déterminer si APH-3 et APH-4 possèdent un domaine d'activation.

4.2.2 APH-3 et APH-4 contiennent un motif « *bZIP-like* » fonctionnel

Comme mentionné dans la section « APH-3 et APH-4 requièrent des NLS différents de HBZ », des mutants de délétion ont été générés où chacun des domaines potentiels a été progressivement enlevé. Ces mutants ont été utilisés afin de caractériser les régions permettant à APH-3 et APH-4 d'accomplir leur régulation au niveau de la transcription. Pour ce faire, la même méthode que celle énoncée dans la section précédente a été utilisée, à l'exception que les mutants de délétions de APH-3 et APH-4 ont également été utilisés. Le facteur JunB n'a pas fait l'objet de cette étude puisque des résultats similaires à ceux pour c-Jun étaient attendus. Lorsque le motif « leucine zipper » est absent, l'activation de la transcription dépendante de c-Jun et JunD est complètement abolie. Ces résultats n'étaient pas attendus puisque selon les analyses bioinformatiques utilisant le site « 2ZIP server », APH-3 et APH-4 ne contiennent pas de motif « leucine zipper » classique. De façon intéressante, la région entre les positions 109 et 150 inclusivement de APH-4 est capable de former un « coiled-coil » selon des analyses *in silico* « Paircoil » détectant des hélices alpha

(seuil 0,5 et le score de cette région était d'environ 0,7) (Berger et al., 1995). Lorsque la séquence en acides aminés de APH-4 est alignée avec celle d'HBZ, cette région représente en effet le motif « leucine zipper » de HBZ et le « leucine zipper-like » de APH-4. Le résultat obtenu pour APH-3 a été négatif lors de cette analyse. Comme mentionné dans la section «État de connaissances», APH-3 et APH-4 contiennent dans la région concernée une leucine à tout les 6-8 acides aminées, contrairement à l'heptade typique de ce type de motif. Cependant, des protéines dites bZIP atypiques ont déjà été mises en évidence telles que le facteur de transcription Zta chez EBV (Schelcher et al., 2007).

Cette protéine codée par le gène *BZLF1* (connue sous le nom de *ZEBRA*) permet le changement de la phase latente à lytique lors d'une infection par EBV. Zta forme des dimères *via* son motif « leucine zipper » en se repliant en un « coiled-coil ». De façon intéressante, Zta ne contient pas d'heptade de leucine dans cette région. De plus, il a été démontré qu'un résidu hydrophobe doit être présent à tous les 4 résidus (position « a ») et ensuite 3 résidus (position « d ») de l'heptade ((*abcdefg*)_n) (O'Shea et al., 1991). Ces résidus se retrouvent du même côté de l'hélice lors du repliement. Aux positions « e » et « g » doit se retrouver des résidus chargés (O'Shea et al., 1991). Cet arrangement permet au peptide de pouvoir former un « coiled-coil » (O'Shea et al., 1991). Zta présente en effet des heptades de résidus hydrophobes lui permettant ainsi de former son dimère (Chang et al., 1990). Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que cet événement était probablement survenu au cours de l'évolution permettant à cette protéine d'interagir avec d'autres protéines impliquées dans ce type infection (Chang et al., 1990). De façon intéressante, il a été démontré par mutagenèse que la totalité des leucines situées dans le motif «leucine zipper» de c-Fos et c-Jun n'était pas nécessaire afin que ceux-ci puissent aussi former un « coiled-coil » leur permettant de dimériser avec d'autres protéines (Ransone et al., 1989). Ces études suggèrent donc que les heptades de leucines de 30 à 40 acides aminés en longueur ne semblent pas si indispensables que prétendu.

Il existe une protéine homologue à Zta nommée K-bZIP du virus herpétique humain 8. Il a toujours été suggéré que cette protéine possédait un motif « leucine zipper » atypique (d'où son nom) pouvant former un « coiled-coil » tout comme Zta puisque celle-ci démontre des fonctions similaires une par rapport à l'autre (Al Mehairi et al., 2005). Cependant, Al

Mehairi *et al.* (2005) ont mis en évidence que K-bZIP se replie en un feuillet beta plutôt qu'une hélice α (malgré les prédictions bioinformatique) et qu'elle n'agit pas comme un bZIP (Al Mehairi et al., 2005). Cependant, la région où se situe le « leucine zipper » atypique permet à cette protéine de former des multimères (Al Mehairi et al., 2005).

En prenant en considération ces informations, il devient donc pertinent de déterminer si la région suggérée du motif « leucine zipper » de APH-3 et APH-4 fait partie d'un bZIP fonctionnel ou, s'il s'agit d'une coïncidence et que cette région est nécessaire pour la fonction de ces protéines. Ainsi, la modulation de l'activation de la transcription Jun-dépendante par APH-3 et APH-4 ayant subi des mutations ponctuelles dans la région du « leucine zipper » pourrait être mesurée afin d'évaluer l'indispensabilité des résidus hydrophobes situés à des positions non habituels (heptade non respecté). De plus, afin de déterminer si APH-3 et APH-4 possèdent un DBD, l'efficacité de la région basique située en N-terminal du « leucine zipper » pourrait être évaluée par un retard sur gel. Ces expériences valideraient la présence ou non d'un nouveau type de bZIP atypique.

Aussi, il est important de mentionner que l'effet des mutants a également fait l'objet d'une analyse quant à la régulation de la trans-activation par Tax sur le LTR de HTLV-1. Les résultats suggèrent que le motif « leucine zipper » et le bZIP atypique de APH-3 ne sont pas essentiels pour inhiber la trans-activation médiée par Tax (voir annexe figure 1). Cependant, le mutant de délétion pour le motif « leucine zipper » de APH-4 semble moins efficace lorsqu'il s'agit d'inhiber la trans-activation, alors que le mutant bZIP de APH-4 inhibe autant que APH-4 sauvage (annexe figure 1). Ainsi, si le « leucine zipper » de APH-4 était vraiment essentiel, nous ne retrouverions pas cette inhibition rétablie avec le mutant bZIP, démontrée par un niveau d'activité luciférase bas. Ces observations ne concordent pas avec les résultats obtenus lors de l'étude transcriptionnelle Jun dépendante. Selon les résultats de cette étude préliminaire, il est probable que APH-3 et APH-4 régulent la transcription à l'aide de mécanismes différents de celui d'HBZ. Cependant, il est important de reproduire ces résultats avant toutes autres conclusions.

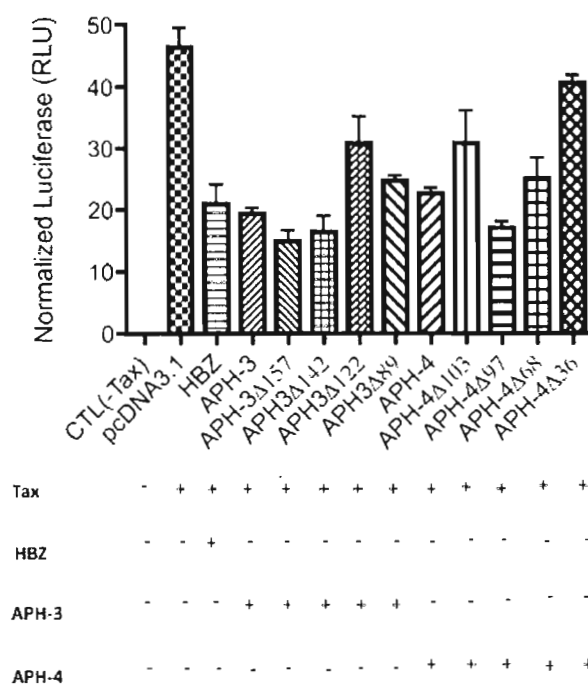
4.2.3. Modification post-traductionnelle de APH-3

L'immunobuvardage de type western-blot a révélé un signal avec un poids moléculaire plus élevé que celui attendu pour la protéine APH-3. Généralement, un signal tel que celui mentionné suggère une modification post-traductionnelle. Une protéine SUMO (*small ubiquitin-like modifiers*) a une taille d'environ 11 kDa. Lors d'analyses bioinformatiques utilisant le programme SUMOsp 2.0 web server, un résultat positif a été obtenu à la position 145 de la protéine APH-3 (KRQ**K**KER). Ainsi, la séquence consensus d'un site sumoylé est caractérisée par aKxE où le « a » représente un résidu aliphatique et le « x » un résidu aléatoire (Melchior, 2000). Selon le programme utilisé, le site identifié chez APH-3 représenterait une séquence non consensus. De façon intéressante, il a été démontré que les modifications post-traductionnelles par SUMO sont impliquées dans le développement de maladies neurodégénératives (Lieberman, 2004). De plus, Navascués *et al.* (2007) ont mis en évidence que SUMO-1 est localisé dans un nouveau compartiment nucléaire nommé SNB (*SUMO-1 nuclear body*) où se retrouve une grande quantité de c-Jun, p300 et CREB et qui se distingue des corps Cajal ainsi que des PML (Navascués *et al.*, 2007). Aussi, la protéine SUMO1 est reconnue pour moduler la fonction de plusieurs facteurs de transcription (Bailey and O'Hare, 2005). Pour ces raisons, il devient pertinent d'évaluer si APH-3 est en effet sumoylée. Cette prédiction pourrait être évaluée par la méthode de co-immunoprécipitation utilisant des anticorps anti-SUMO. Toutefois, il est important de ne pas éliminer la possibilité d'un autre type de modification post-traductionnelle telle que l'ubiquitination. De plus, selon les observations faites en microscope, un agrégat est retrouvé adjacent au noyau. APH-3 pourrait être dégradé par la voie ubiquitine-protéasome. Cependant, cet agrégat est également présent chez les cellules exprimant APH-2 et APH-4. Cette modification pourrait faire l'objet d'études en utilisant aussi la technique de co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-ubiquitine.

4.3 Conclusion

Environ 5% des individus infectés par HTLV-1 développent l'ATLL ou le HAM/TSP. Le mécanisme menant à ces maladies est mal compris même si l'implication de la protéine trans-activatrice Tax a toujours été grandement étudiée. De récentes études ont démontré que Tax n'est pas toujours exprimée dans les cellules ATLL dû soit à des mutations dans sa séquence codante, l'élimination ou encore l'hyperméthylation du LTR 5'. Cependant, il a été démontré que la nouvelle protéine rétrovirale HBZ, traduite à partir d'un transcrit antisens naturel, était toujours présente dans les cellules cancéreuses. Lors de cette étude, les nouvelles protéines virales, APH-3 et APH-4 ont été mises en évidence chez les rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4. Notre équipe a clairement démontré que ces protéines peuvent être impliquées dans la réplication rétrovirale à différents niveaux. Les protéines traduites à partir du brin antisens semblent donc être conservées chez la famille des rétrovirus puisque ce phénomène est présent chez HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3, HTLV-4 mais aussi chez le VIH. De plus, la transcription antisens a été caractérisée chez FIV et MLV. Jusqu'à récemment, les rétrovirologistes ignoraient que la régulation virale de cette famille était aussi rigoureuse et complexe. Aujourd'hui encore, aucun traitement ne s'est avéré efficace pour lutter contre une infection par HTLV. Finalement, les travaux réalisés durant ces deux années de maîtrise, portant sur la transcription antisens de certains rétrovirus ainsi que leur étude en général, ouvrent une nouvelle voie quant au mécanisme de la réplication rétrovirale visant à améliorer notre compréhension dans le domaine de la rétrovirologie.

Annexe



Annexe 1. Modulation de la trans-activation par Tax 1 selon les mutants de délétion APH-3 et APH-4. Les cellules 293T ont été co-transfectées avec soit le vecteur d'expression APH-3, APH-3Δ157, APH-3Δ142, APH-3Δ122, APH-3Δ89, APH-4, APH-4Δ103, APH-4Δ97, APH-4Δ68 ou APH-4Δ36, le promoteur de collagénase en amont du gène de luciférase, le vecteur d'expression de Tax 1 et le vecteur pRcActin-lacZ afin de normaliser les résultats. Les cellules ont été lysées et l'activité de luciférase a été mesurée et 48 heures post-transfection. Les résultats ont été normalisés par la beta-galactosidase (+/- S.D). Cette figure est une représentation de 3 expériences indépendantes.

RÉFÉRENCES

- Al Mehairi, S., Cerasoli, E. and Sinclair, A. J.** (2005). Investigation of the multimerization region of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) protein K-bZIP: the proposed leucine zipper region encodes a multimerization domain with an unusual structure. *J Virol* **79**, 7905-10.
- Alber, T.** (1992). Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 205-10.
- Aoyagi, T., Takahashi, M., Higuchi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Kiyono, T., Aoyagi, Y. and Fujii, M.** (2010). The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes* **40**, 193-9.
- Araujo, A. and Hall, W. W.** (2004). Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol* **56**, 10-9.
- Arnold, J., Yamamoto, B., Li, M., Phipps, A. J., Younis, I., Lairmore, M. D. and Green, P. L.** (2006). Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood* **107**, 3976-82.
- Arnold, J., Zimmerman, B., Li, M., Lairmore, M. D. and Green, P. L.** (2008). Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* **112**, 3788-97.
- Azran, I., Schavinsky-Khrapunsky, Y. and Aboud, M.** (2004). Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* **1**, 20.
- Bailey, D. and O'Hare, P.** (2005). Comparison of the SUMO1 and ubiquitin conjugation pathways during the inhibition of proteasome activity with evidence of SUMO1 recycling. *Biochem J* **392**, 271-81.
- Banerjee, P., Rochford, R., Antel, J., Canute, G., Wrzesinski, S., Sieburg, M. and Feuer, G.** (2007). Proinflammatory cytokine gene induction by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 Tax in primary human glial cells. *J Virol* **81**, 1690-700.
- Bangham, C. R.** (2003). The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol* **84**, 3177-89.
- Barbeau, B. and Mesnard, J. M.** (2007). Does the HBZ gene represent a new potential target for the treatment of adult T-cell leukemia? *Int Rev Immunol* **26**, 283-304.

Barbeau, B., Robichaud, G. A., Fortin, J. F. and Tremblay, M. J. (2001). Negative regulation of the NFAT1 factor by CD45: implication in HIV-1 long terminal repeat activation. *J Immunol* **167**, 2700-13.

Barnard, A. L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G. P. and Bangham, C. R. (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* **106**, 988-95.

Bartman, M. T., Kaidarova, Z., Hirschhorn, D., Sacher, R. A., Friley, J., Garratty, G., Gible, J., Smith, J. W., Newman, B., Yeo, A. E. et al. (2008). Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection. *Blood* **112**, 3995-4002.

Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C. and Mesnard, J. M. (2003). The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* **278**, 43620-7.

Bedford, M., Arman, E., Orr-Urtreger, A. and Lonai, P. (1995). Analysis of the Hoxd-3 gene: structure and localization of its sense and natural antisense transcripts. *DNA Cell Biol* **14**, 295-304.

Benvenisty, N., Ornitz, D. M., Bennett, G. L., Sahagan, B. G., Kuo, A., Cardiff, R. D. and Leder, P. (1992). Brain tumours and lymphomas in transgenic mice that carry HTLV-I LTR/c-myc and Ig/tax genes. *Oncogene* **7**, 2399-405.

Berger, B., Wilson, D. B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M. and Kim, P. S. (1995). Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8259-63.

Bindhu, M., Nair, A. and Lairmore, M. D. (2004). Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. *Front Biosci* **9**, 2556-76.

Boisvert, F. M., Kruhlak, M. J., Box, A. K., Hendzel, M. J. and Bazett-Jones, D. P. (2001). The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* **152**, 1099-106.

Briggs, N. C., Battjes, R. J., Cantor, K. P., Blattner, W. A., Yellin, F. M., Wilson, S., Ritz, A. L., Weiss, S. H. and Goedert, J. J. (1995). Seroprevalence of human T cell lymphotropic virus type II infection, with or without human immunodeficiency virus type 1 coinfection, among US intravenous drug users. *J Infect Dis* **172**, 51-8.

Briquet, S., Richardson, J., Vanhee-Brossollet, C. and Vaquero, C. (2001). Natural antisense transcripts are detected in different cell lines and tissues of cats infected with feline immunodeficiency virus. *Gene* **267**, 157-64.

Briquet, S. and Vaquero, C. (2002). Immunolocalization studies of an antisense protein in HIV-1-infected cells and viral particles. *Virology* **292**, 177-84.

Brown, T. A. (2002). *Genome*. New-York: Wiley-Liss.

Burmeister, T. (2001). Oncogenic retroviruses in animals and humans. *Rev Med Virol* **11**, 369-80.

Busch, S. J. and Sassone-Corsi, P. (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet* **6**, 36-40.

Calattini, S., Chevalier, S. A., Duprez, R., Afonso, P., Froment, A., Gessain, A. and Mahieux, R. (2006). Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *J Virol* **80**, 9876-88.

Calattini, S., Chevalier, S. A., Duprez, R., Bassot, S., Froment, A., Mahieux, R. and Gessain, A. (2005). Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* **2**, 30.

Cavanagh, M. H., Landry, S., Audet, B., Arpin-Andre, C., Hivin, P., Pare, M. E., Thete, J., Wattel, E., Marriott, S. J., Mesnard, J. M. et al. (2006). HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology* **3**, 15.

Chandhasin, C., Ducu, R. I., Berkovich, E., Kastan, M. B. and Marriott, S. J. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 tax attenuates the ATM-mediated cellular DNA damage response. *J Virol* **82**, 6952-61.

Chang, Y. N., Dong, D. L., Hayward, G. S. and Hayward, S. D. (1990). The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J Virol* **64**, 3358-69.

Chevalier, S. A., Ko, N. L., Calattini, S., Mallet, A., Prevost, M. C., Kehn, K., Brady, J. N., Kashanchi, F., Gessain, A. and Mahieux, R. (2008). Construction and characterization of a human T-cell lymphotropic virus type 3 infectious molecular clone. *J Virol* **82**, 6747-52.

Chevalier, S. A., Meertens, L., Pise-Masison, C., Calattini, S., Park, H., Alhaj, A. A., Zhou, M., Gessain, A., Kashanchi, F., Brady, J. N. et al. (2006). The tax protein from the primate T-cell lymphotropic virus type 3 is expressed in vivo and is functionally related to HTLV-1 Tax rather than HTLV-2 Tax. *Oncogene* **25**, 4470-82.

Chu, Z. L., Shin, Y. A., Yang, J. M., DiDonato, J. A. and Ballard, D. W. (1999). IKKgamma mediates the interaction of cellular IkappaB kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1. *J Biol Chem* **274**, 15297-300.

Cimarelli, A., Duclos, C. A., Gessain, A., Cattaneo, E., Casoli, C., Biglione, M., Mauclore, P. and Bertazzoni, U. (1995). Quantification of HTLV-II proviral copies by competitive polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cells of Italian injecting drug users, central Africans, and Amerindians. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **10**, 198-204.

Clerc, I., Hivin, P., Rubbo, P. A., Lemasson, I., Barbeau, B. and Mesnard, J. M. (2009). Propensity for HBZ-SP1 isoform of HTLV-I to inhibit c-Jun activity correlates with sequestration of c-Jun into nuclear bodies rather than inhibition of its DNA-binding activity. *Virology* **391**, 195-202.

Clerc, I., Polakowski, N., Andre-Arpin, C., Cook, P., Barbeau, B., Mesnard, J. M. and Lemasson, I. (2008). An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem* **283**, 23903-13.

Cochrane, A. W., Perkins, A. and Rosen, C. A. (1990). Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J Virol* **64**, 881-5.

Coffin, J. M., Hughes, S. H. and Varmus, H. E. (1997). Retroviruses.

Coscoy, L., Gonzalez-Dunia, D., Tangy, F., Syan, S., Brahic, M. and Ozden, S. (1998). Molecular mechanism of tumorigenesis in mice transgenic for the human T cell leukemia virus Tax gene. *Virology* **248**, 332-41.

Coskun, A. K. and Sutton, R. E. (2005). Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. *J Virol* **79**, 4150-8.

Court, D., Green, L. and Echols, H. (1975). Positive and negative regulation by the cII and cIII gene products of bacteriophage lambda. *Virology* **63**, 484-91.

Dang, C. V. and Lee, W. M. (1989). Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem* **264**, 18019-23.

Delamarre, L., Rosenberg, A. R., Pique, C., Pham, D. and Dokhelar, M. C. (1997). A novel human T-leukemia virus type 1 cell-to-cell transmission assay permits definition of SU glycoprotein amino acids important for infectivity. *J Virol* **71**, 259-66.

Doerig, C., Pizer, L. I. and Wilcox, C. L. (1991). An antigen encoded by the latency-associated transcript in neuronal cell cultures latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* **65**, 2724-7.

Dundr, M. and Misteli, T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* **356**, 297-310.

Dundr, M., Misteli, T. and Olson, M. O. (2000). The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* **150**, 433-46.

Duong, Y. T., Jia, H., Lust, J. A., Garcia, A. D., Tiffany, A. J., Heneine, W. and Switzer, W. M. (2008). Short communication: Absence of evidence of HTLV-3 and HTLV-4 in patients with large granular lymphocyte (LGL) leukemia. *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**, 1503-5.

Egan, J. F., O'Leary, B., Lewis, M. J., Mulcahy, F., Sheehy, N., Hasegawa, H., Fitzpatrick, F., O'Connor, J. J., O'Riordan, J. and Hall, W. W. (1999). High rate of human T lymphotropic virus type IIa infection in HIV type 1-infected intravenous drug abusers in Ireland. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 699-705.

Emmott, E., Dove, B. K., Howell, G., Chappell, L. A., Reed, M. L., Boyne, J. R., You, J. H., Brooks, G., Whitehouse, A. and Hiscox, J. A. (2008). Viral nucleolar localisation signals determine dynamic trafficking within the nucleolus. *Virology* **380**, 191-202.

Emmott, E. and Hiscox, J. A. (2009). Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* **10**, 231-8.

Etzel, A., Shibata, G. Y., Rozman, M., Jorge, M. L., Damas, C. D. and Segurado, A. A. (2001). HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**, 185-90.

Farrell, C. M. and Lukens, L. N. (1995). Naturally occurring antisense transcripts are present in chick embryo chondrocytes simultaneously with the down-regulation of the alpha 1 (I) collagen gene. *J Biol Chem* **270**, 3400-8.

Feuer, G. and Green, P. L. (2005). Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* **24**, 5996-6004.

Fleury, H., J.A. . (2009). *Virologie humaine*: Elsevier Masson.

Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. and Skalka, A. M. (2004). Principles of virology. 918.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-60.

Fortin, J. F., Cantin, R., Lamontagne, G. and Tremblay, M. (1997). Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* **71**, 3588-96.

Franchini, G. (1995). Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood* **86**, 3619-39.

Fujii, M., Niki, T., Mori, T., Matsuda, T., Matsui, M., Nomura, N. and Seiki, M. (1991). HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. *Oncogene* **6**, 1023-9.

Fukushima, Y., Takahashi, H., Hall, W. W., Nakasone, T., Nakata, S., Song, P., Dinh Duc, D., Hien, B., Nguyen, X. Q., Ngoc Trinh, T. et al. (1995). Extraordinary high rate of HTLV type II seropositivity in intravenous drug abusers in south Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**, 637-45.

Gallo, R. C. (2005). History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* **24**, 5926-30.

Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C. and Mesnard, J. M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol* **76**, 12813-22.

Geleziunas, R., Ferrell, S., Lin, X., Mu, Y., Cunningham, E. T., Jr., Grant, M., Connelly, M. A., Hambor, J. E., Marcu, K. B. and Greene, W. C. (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF-kappaB involves activation of the IkappaB kinase alpha (IKKalpha) and IKKbeta cellular kinases. *Mol Cell Biol* **18**, 5157-65.

Gomez Corredor, A. and Archambault, D. (2009). The bovine immunodeficiency virus rev protein: identification of a novel lentiviral bipartite nuclear localization signal harboring an atypical spacer sequence. *J Virol* **83**, 12842-53.

Gordon, Y. J., Johnson, B., Romanowski, E. and Araullo-Cruz, T. (1988). RNA complementary to herpes simplex virus type 1 ICP0 gene demonstrated in neurons of human trigeminal ganglia. *J Virol* **62**, 1832-5.

Green, P. L., Ross, T. M., Chen, I. S. and Pettiford, S. (1995). Human T-cell leukemia virus type II nucleotide sequences between env and the last exon of tax/rex are not required for viral replication or cellular transformation. *J Virol* **69**, 387-94.

Grossman, W. J., Kimata, J. T., Wong, F. H., Zutter, M., Ley, T. J. and Ratner, L. (1995). Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1057-61.

Hahn, B. H., Shaw, G. M., Popovic, M., Lo Monaco, A., Gallo, R. C. and Wong-Staal, F. (1984). Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-ib) from an African patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. *Int J Cancer* **34**, 613-8.

Halin, M., Douceron, E., Clerc, I., Journo, C., Ko, N. L., Landry, S., Murphy, E. L., Gessain, A., Lemasson, I., Mesnard, J. M. et al. (2009). Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. *Blood* **114**, 2427-38.

Harhaj, E. W. and Sun, S. C. (1999). IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J Biol Chem* **274**, 22911-4.

Hatanaka, M. (1990). Discovery of the nucleolar targeting signal. *Bioessays* **12**, 143-8.

Hildebrandt, M. and Nellen, W. (1992). Differential antisense transcription from the Dictyostelium EB4 gene locus: implications on antisense-mediated regulation of mRNA stability. *Cell* **69**, 197-204.

Hisada, M., Stuver, S. O., Okayama, A., Li, H. C., Sawada, T., Hanchard, B. and Mueller, N. E. (2004). Persistent paradox of natural history of human T lymphotropic virus type I: parallel analyses of Japanese and Jamaican carriers. *J Infect Dis* **190**, 1605-9.

Hivin, P., Arpin-Andre, C., Clerc, I., Barbeau, B. and Mesnard, J. M. (2006). A modified version of a Fos-associated cluster in HBZ affects Jun transcriptional potency. *Nucleic Acids Res* **34**, 2761-72.

Hivin, P., Basbous, J., Raymond, F., Henaff, D., Arpin-Andre, C., Robert-Hebmann, V., Barbeau, B. and Mesnard, J. M. (2007). The HBZ-SP1 isoform of human T-cell leukemia virus type I represses JunB activity by sequestration into nuclear bodies. *Retrovirology* **4**, 14.

Hivin, P., Frederic, M., Arpin-Andre, C., Basbous, J., Gay, B., Thebault, S. and Mesnard, J. M. (2005). Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J Cell Sci* **118**, 1355-62.

Hoopes, B. C. and McClure, W. R. (1985). A cII-dependent promoter is located within the Q gene of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 3134-8.

Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., Tanaka, Y., Osame, M. and Bangham, C. R. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**, 1713-6.

Isono, O., Ohshima, T., Saeki, Y., Matsumoto, J., Hijikata, M., Tanaka, K. and Shimotohno, K. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination. *J Biol Chem* **283**, 34273-82.

Iwai, K., Mori, N., Oie, M., Yamamoto, N. and Fujii, M. (2001). Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology* **279**, 38-46.

Iwasaki, Y. (1990). Pathology of chronic myelopathy associated with HTLV-I infection (HAM/TSP). *J Neurol Sci* **96**, 103-23.

Izant, J. G. and Weintraub, H. (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* **36**, 1007-15.

Jans, D. A., Xiao, C. Y. and Lam, M. H. (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* **22**, 532-44.

Jones, K. S., Fugo, K., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y., Bertolette, D. C., Lisinski, I., Cushman, S. W., Jacobson, S. and Ruscetti, F. W. (2006). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol* **80**, 8291-302.

Kalyanaraman, V. S., Sarngadharan, M. G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D. and Gallo, R. C. (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**, 571-3.

Kashanchi, F. and Brady, J. N. (2005). Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene* **24**, 5938-51.

Khabbaz, R. F., Hartel, D., Lairmore, M., Horsburgh, C. R., Schoenbaum, E. E., Roberts, B., Hartley, T. M. and Friedland, G. (1991). Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection in a cohort of New York intravenous drug users: an old infection? *J Infect Dis* **163**, 252-6.

Kimelman, D. and Kirschner, M. W. (1989). An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell* **59**, 687-96.

Kind, J. and van Steensel, B. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Curr Opin Cell Biol.*

Kramer, A., Maloney, E. M., Morgan, O. S., Rodgers-Johnson, P., Manns, A., Murphy, E. L., Larsen, S., Cranston, B., Murphy, J., Benichou, J. et al. (1995). Risk factors and cofactors for human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica. *Am J Epidemiol* **142**, 1212-20.

Kubota, S., Siomi, H., Satoh, T., Endo, S., Maki, M. and Hatanaka, M. (1989). Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein. *Biochem Biophys Res Commun* **162**, 963-70.

Kuhlmann, A. S., Villaudy, J., Gazzolo, L., Castellazzi, M., Mesnard, J. M. and Duc Dodon, M. (2007). HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* **4**, 92.

la Cour, T., Kierner, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**, 527-36.

Lagunoff, M. and Roizman, B. (1994). Expression of a herpes simplex virus 1 open reading frame antisense to the gamma(1)34.5 gene and transcribed by an RNA 3' coterminal with the unspliced latency-associated transcript. *J Virol* **68**, 6021-8.

Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R. B. and Bex, F. (2005). Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* **25**, 10391-406.

Landry, S., Halin, M., Lefort, S., Audet, B., Vaquero, C., Mesnard, J. M. and Barbeau, B. (2007). Detection, characterization and regulation of antisense transcripts in HIV-1. *Retrovirology* **4**, 71.

Landry, S., Halin, M., Vargas, A., Lemasson, I., Mesnard, J. M. and Barbeau, B. (2008). Upregulation of HTLV-1 antisense transcription by the viral Tax protein. *J Virol*.

Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-64.

Lankenau, S., Corces, V. G. and Lankenau, D. H. (1994). The Drosophila micropia retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* **14**, 1764-75.

Larocca, D., Chao, L. A., Seto, M. H. and Brunck, T. K. (1989). Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 1006-13.

Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S. and Chin, W. W. (1989). A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA alpha transcriptional unit. *Mol Cell Biol* **9**, 1128-36.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-54.

Lieberman, A. P. (2004). SUMO, a ubiquitin-like modifier implicated in neurodegeneration. *Exp Neurol* **185**, 204-7.

Ludwig, L. B., Ambrus, J. L., Jr., Krawczyk, K. A., Sharma, S., Brooks, S., Hsiao, C. B. and Schwartz, S. A. (2006). Human Immunodeficiency Virus-Type 1 LTR DNA contains an intrinsic gene producing antisense RNA and protein products. *Retrovirology* **3**, 80.

Manel, N., Kim, F. J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M. and Battini, J. L. (2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* **115**, 449-59.

Matsumoto, J., Ohshima, T., Isono, O. and Shimotohno, K. (2005). HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene* **24**, 1001-10.

Matsumoto, K., Shibata, H., Fujisawa, J. I., Inoue, H., Hakura, A., Tsukahara, T. and Fujii, M. (1997). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein transforms rat fibroblasts via two distinct pathways. *J Virol* **71**, 4445-51.

Matsuoka, M. and Jeang, K. T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* **7**, 270-80.

Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626.

Mesnard, J. M., Barbeau, B. and Devaux, C. (2006). HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. *Blood* **108**, 3979-82.

Michael, N. L., D'Arcy, L., Ehrenberg, P. K. and Redfield, R. R. (1994a). Naturally occurring genotypes of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat display a wide range of basal and Tat-induced transcriptional activities. *J Virol* **68**, 3163-74.

Michael, N. L., Vahey, M. T., d'Arcy, L., Ehrenberg, P. K., Mosca, J. D., Rappaport, J. and Redfield, R. R. (1994b). Negative-strand RNA transcripts are produced in human immunodeficiency virus type 1-infected cells and patients by a novel promoter downregulated by Tat. *J Virol* **68**, 979-87.

Miller, R. H. (1988). Human immunodeficiency virus may encode a novel protein on the genomic DNA plus strand. *Science* **239**, 1420-2.

Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushige, S., Matsubara, K., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1989). Two *erbA* homologs encoding proteins with

different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* **57**, 31-9.

Miyazaki, M., Yasunaga, J., Taniguchi, Y., Tamiya, S., Nakahata, T. and Matsuoka, M. (2007). Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* **81**, 5714-23.

Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtsuki, Y., Shiraishi, Y., Nagata, K. and Hinuma, Y. (1981). Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* **294**, 770-1.

Mizuno, T., Chou, M. Y. and Inouye, M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1966-70.

Moriuchi, M., Moriuchi, H. and Fauci, A. S. (1999). HTLV type I Tax activation of the CXCR4 promoter by association with nuclear respiratory factor 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 821-7.

Mortreux, F., Gabet, A. S. and Wattel, E. (2003). Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia* **17**, 26-38.

Murata, K., Hayashibara, T., Sugahara, K., Uemura, A., Yamaguchi, T., Harasawa, H., Hasegawa, H., Tsuruda, K., Okazaki, T., Koji, T. et al. (2006). A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J Virol* **80**, 2495-505.

Murphy, E. L., Hanchard, B., Figueroa, J. P., Gibbs, W. N., Lofters, W. S., Campbell, M., Goedert, J. J. and Blattner, W. A. (1989). Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* **43**, 250-3.

Murphy, P. R. and Knee, R. S. (1994). Identification and characterization of an antisense RNA transcript (gfg) from the human basic fibroblast growth factor gene. *Mol Endocrinol* **8**, 852-9.

Nakagawa, M., Nakahara, K., Maruyama, Y., Kawabata, M., Higuchi, I., Kubota, H., Izumo, S., Arimura, K. and Osame, M. (1996). Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* **2**, 345-55.

Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Vaque, J. P., Lafarga, M. and Berciano, M. T. (2007). Characterization of a new SUMO-1 nuclear body (SNB) enriched in pCREB, CBP, c-Jun in neuron-like UR61 cells. *Chromosoma* **116**, 441-51.

Nejmeddine, M., Barnard, A. L., Tanaka, Y., Taylor, G. P. and Bangham, C. R. (2005). Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* **280**, 29653-60.

O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S. and Alber, T. (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**, 539-44.

O'Shea, E. K., Rutkowski, R. and Kim, P. S. (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**, 538-42.

Ohshima, T., Mukai, R., Nakahara, N., Matsumoto, J., Isono, O., Kobayashi, Y., Takahashi, S. and Shimotohno, K. (2010). HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. *J Cell Biochem*.

Okajima, M., Takahashi, M., Higuchi, M., Ohsawa, T., Yoshida, S., Yoshida, Y., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F. and Fujii, M. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induces an aberrant clustering of the tumor suppressor Scribble through the PDZ domain-binding motif dependent and independent interaction. *Virus Genes* **37**, 231-40.

Peeters, A., Lambert, P. F. and Deacon, N. J. (1996). A fourth Sp1 site in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat is essential for negative-sense transcription. *J Virol* **70**, 6665-72.

Pestka, S., Daugherty, B. L., Jung, V., Hotta, K. and Pestka, R. K. (1984). Anti-mRNA: specific inhibition of translation of single mRNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7525-8.

Poiesz, B. J., Papsidero, L. D., Ehrlich, G., Sherman, M., Dube, S., Poiesz, M., Dillon, K., Ruscetti, F. W., Slamon, D., Fang, C. et al. (2001). Prevalence of HTLV-I-associated T-cell lymphoma. *Am J Hematol* **66**, 32-8.

Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D. and Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7415-9.

Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Reitz, M. S., Kalyanaraman, V. S. and Gallo, R. C. (1981). Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature* **294**, 268-71.

Prang, N., Wolf, H. and Schwarzmann, F. (1995). Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by posttranscriptional negative regulation of BZLF1. *J Virol* **69**, 2644-8.

- Proietti, F. A., Carneiro-Proietti, A. B., Catalan-Soares, B. C. and Murphy, E. L.** (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* **24**, 6058-68.
- Ransone, L. J., Visvader, J., Sassone-Corsi, P. and Verma, I. M.** (1989). Fos-Jun interaction: mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins. *Genes Dev* **3**, 770-81.
- Rasmussen, M. H., Ballarin-Gonzalez, B., Liu, J., Lassen, L. B., Fuchtbauer, A., Fuchtbauer, E. M., Nielsen, A. L. and Pedersen, F. S.** (2010). Antisense transcription in gammaretroviruses as a mechanism of insertional activation of host genes. *J Virol* **84**, 3780-8.
- Reinke, A. W., Grigoryan, G. and Keating, A. E.** (2010). Identification of bZIP interaction partners of viral proteins HBZ, MEQ, BZLF1, and K-bZIP using coiled-coil arrays. *Biochemistry* **49**, 1985-97.
- Rosenblatt, J. D., Golde, D. W., Wachsman, W., Giorgi, J. V., Jacobs, A., Schmidt, G. M., Quan, S., Gasson, J. C. and Chen, I. S.** (1986). A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* **315**, 372-7.
- Rubenstein, J. L., Nicolas, J. F. and Jacob, F.** (1984). [Nonsense RNA: a tool for specifically inhibiting the expression of a gene in vivo]. *C R Acad Sci III* **299**, 271-4.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M. and Matsuoka, M.** (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 720-5.
- Schelcher, C., Al Mehairi, S., Verrall, E., Hope, Q., Flower, K., Bromley, B., Woolfson, D. N., West, M. J. and Sinclair, A. J.** (2007). Atypical bZIP domain of viral transcription factor contributes to stability of dimer formation and transcriptional function. *J Virol* **81**, 7149-55.
- Scholzen, T., Endl, E., Wohlenberg, C., van der Sar, S., Cowell, I. G., Gerdes, J. and Singh, P. B.** (2002). The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J Pathol* **196**, 135-44.
- Shoji, T., Higuchi, M., Kondo, R., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Aoyagi, Y. and Fujii, M.** (2009). Identification of a novel motif responsible for the distinctive transforming activity of human T-cell leukemia virus (HTLV) type 1 Tax1 protein from HTLV-2 Tax2. *Retrovirology* **6**, 83.
- Sieburg, M., Tripp, A., Ma, J. W. and Feuer, G.** (2004). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax oncoproteins modulate cell cycle progression and apoptosis. *J Virol* **78**, 10399-409.

Skeiky, Y. A. and Iatrou, K. (1990). Silkworm chorion antisense RNA. Structural characterization, developmental regulation and evolutionary conservation. *J Mol Biol* **213**, 53-66.

Slattery, J. P., Franchini, G. and Gessain, A. (1999). Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res* **9**, 525-40.

Suemori, K., Fujiwara, H., Ochi, T., Ogawa, T., Matsuoka, M., Matsumoto, T., Mesnard, J. M. and Yasukawa, M. (2009). HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* **90**, 1806-11.

Suzuki, T., Hirai, H., Fujisawa, J., Fujita, T. and Yoshida, M. (1993). A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kappa B p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kappa B site and CARG box. *Oncogene* **8**, 2391-7.

Suzuki, T., Ohsugi, Y., Uchida-Toita, M., Akiyama, T. and Yoshida, M. (1999). Tax oncoprotein of HTLV-1 binds to the human homologue of Drosophila discs large tumor suppressor protein, hDLG, and perturbs its function in cell growth control. *Oncogene* **18**, 5967-72.

Switzer, W. M., Qari, S. H., Wolfe, N. D., Burke, D. S., Folks, T. M. and Heneine, W. (2006). Ancient origin and molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 3 revealed by complete genome analysis. *J Virol* **80**, 7427-38.

Tagieva, N. E. and Vaquero, C. (1997). Expression of naturally occurring antisense RNA inhibits human immunodeficiency virus type 1 heterologous strain replication. *J Gen Virol* **78 (Pt 10)**, 2503-11.

Tamura, K. (1996). [Clinical classification of adult T-cell leukemia and its complications]. *Rinsho Byori* **44**, 19-23.

Thebault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C. and Mesnard, J. M. (2004). HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* **562**, 165-70.

Thomas, A., Perzova, R., Abbott, L., Benz, P., Poiesz, M. J., Dube, S., Loughran, T., Ferrer, J., Sheremata, W., Glaser, J. et al. (2010). LGL leukemia and HTLV. *AIDS Res Hum Retroviruses* **26**, 33-40.

Tsubata, C., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F. and Fujii, M. (2005). PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein is essential for the interleukin 2 independent growth induction of a T-cell line. *Retrovirology* **2**, 46.

- Tsuchiya, H., Fujii, M., Niki, T., Tokuhara, M., Matsui, M. and Seiki, M.** (1993). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax activates transcription of the human fra-1 gene through multiple cis elements responsive to transmembrane signals. *J Virol* **67**, 7001-7.
- Uchida, N., Otsuka, T., Arima, F., Shigematsu, H., Fukuyama, T., Maeda, M., Sugio, Y., Itoh, Y. and Niho, Y.** (1999). Correlation of telomerase activity with development and progression of adult T-cell leukemia. *Leuk Res* **23**, 311-6.
- Vanhee-Brossollet, C., Thoreau, H., Serpente, N., D'Auriol, L., Levy, J. P. and Vaquero, C.** (1995). A natural antisense RNA derived from the HIV-1 env gene encodes a protein which is recognized by circulating antibodies of HIV+ individuals. *Virology* **206**, 196-202.
- Vanhee-Brossollet, C. and Vaquero, C.** (1998). Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes? *Gene* **211**, 1-9.
- Vargas, A., Moreau, J., Landry, S., LeBellego, F., Toufaily, C., Rassart, E., Lafond, J. and Barbeau, B.** (2009). Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J Mol Biol* **392**, 301-18.
- Watanabe, M., Muramatsu, M., Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J., Yoshida, M., Arai, K. and Arai, N.** (1993). HTLV-I encoded Tax in association with NF-kappa B precursor p105 enhances nuclear localization of NF-kappa B p50 and p65 in transfected cells. *Oncogene* **8**, 2949-58.
- Wolfe, N. D., Heneine, W., Carr, J. K., Garcia, A. D., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Torimiro, J. N., Prosser, A. T., Lebreton, M., Mpoudi-Ngole, E. et al.** (2005). Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7994-9.
- Xu, Y. and Ganem, D.** Making sense of antisense: seemingly noncoding RNAs antisense to the master regulator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication do not regulate that transcript but serve as mRNAs encoding small peptides. *J Virol* **84**, 5465-75.
- Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T. and Hatanaka, M.** (1996). Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *EMBO J* **15**, 873-87.
- Yin, M. J., Christerson, L. B., Yamamoto, Y., Kwak, Y. T., Xu, S., Mercurio, F., Barbosa, M., Cobb, M. H. and Gaynor, R. B.** (1998). HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 875-84.
- Yoshida, M.** (1993). HTLV-1 Tax: regulation of gene expression and disease. *Trends Microbiol* **1**, 131-5.

Yoshida, M., Miyoshi, I. and Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2031-5.

Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J., Fujisawa, J. and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J Virol* **82**, 9359-68.

Younis, I. and Green, P. L. (2005). The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front Biosci* **10**, 431-45.

Zhao, T., Yasunaga, J. I., Satou, Y., Nakao, M., Takahashi, M., Fujii, M. and Matsuoka, M. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. *Blood*.